

CHARAKTERISIERUNG VON PEPSINFRAGMENTEN AUS BASALMEMBRANKOLLAGEN

vorgelegt von

DETLEF SCHUPPAN aus Essen

März 1982

CHARAKTERISIERUNG VON PEPSINFRAGMENTEN AUS BASALMEMBRANKOLLAGEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie/Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

DETLEF SCHUPPAN aus Essen

März 1982

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Klaus Kühn
2. Berichterstatter : Prof. Dr. Guido Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 30. März 1982



Für Fatuma

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut
für Biochemie in Martinsried in der Zeit vom Januar
1980 bis Oktober 1981 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Kühn danke ich herzlich
für die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Rupert Timpl gilt mein ganz besonderer
Dank für die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Robert Glanville,
Frau Liselotte Sieweck und Frau Sabine Rannenberg
für die Sequenzierungsarbeiten, Herrn Wolfgang
Straßhofer und Frau Monika Meitinger für die Ami-
nosäureanalysen und Frau Vera van Delden für prak-
tische Hinweise.

Allen Kollegen der Abteilung Kühn sei gedankt für
die freundliche Atmosphäre und die gute Zusammen-
arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Größe und Struktur von Basalmembrankollagen	3
1.2. Fragmente der Tripelhelix von Basalmembran- kollagen	8
1.3. Ziele der Doktorarbeit	10
2. Ergebnisse	11
2.1. Isolierung von Pepsinfragmenten der $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$ und $\alpha 3(IV)$ Kette	11
2.2. Reihenfolge und teilweise Aminosäuresequenz von Bromcyan- und tryptischen Peptiden des Fragmentes P1 aus der $\alpha 1(IV)$ Kette des Maus- tumors	13
2.2.1. Reinigung und Eigenschaften der Bromcyan- peptide	13
2.2.2. Reinigung und Eigenschaften der trypti- schen Peptide	20
2.2.3. Nachspaltung von Bromcyan- und tryptischen Peptiden	23
2.2.4. Spaltung einzelner Bromcyanpeptide mit Ther- molysin	28
2.2.5. Spaltung von Peptid T1 mit Thermolysin	28
2.2.6. Spaltung von Peptid T2 mit Thermolysin	30
2.2.7. Sequenzanalyse und Primärstruktur von Frag- ment P1 aus dem Maustumor	32

	Seite
2.3. Charakterisierung von Fragment P1 aus der bovinen Linsenkapsel	39
2.3.1. Spaltung des Fragmentes P1 mit Bromcyan	39
2.3.2. Nachspaltung von Bromcyanpeptiden aus Fragment P1 (Linsenkapsel) mit Trypsin	44
2.3.3. Tryptische Spaltung von Fragment P1 (Linsenkapsel)	45
2.3.4. Sequenzanalyse der Peptide aus dem P1 der Linsenkapsel und Vergleich mit Pep- tiden aus dem P1 der Maus	46
2.4. Charakterisierung von Fragment P2 aus der $\alpha 2(IV)$ Kette der Maus	54
2.5. Charakterisierung von Fragmenten aus der $\alpha 3(IV)$ Kette des Tumorkollagens	60
2.5.1. Bromcyanpeptide des Fragmentes $\alpha 3$	61
2.5.2. Bromcyanpeptide des Fragmentes P4'	63
2.5.3. Bromcyanpeptide des Fragmentes P4	67
3. Diskussion	70
4. Zusammenfassung	82
5. Material und Methoden	84
5.1. Ausgangsmaterial	84
5.2. Chemische und proteolytische Abbaumethoden	87
5.3. Chromatographische Methoden	88
5.4. Analytische Methoden	90
6. Literaturreferenzen	94

Abkürzungen

ATZ	Anilinothiazolinon
BrCN	Bromcyan
CB	Bromcyanpeptid
CM	Carboxymethyl
DEAE	Diäthylaminoäthyl
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
Polybrene	Poly-1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylen- methylbromid
PTH	Phenylthiohydantoin
Quadrol	N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)-äthylen- diamin
T	tryptisches Peptid
Th	thermolytisches Peptid
TPCK	N-Tosyl-phenylalanyl-chloromethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung und Problemstellung

Basalmembranen stellen eine dünne, amorphe Schicht extrazellulären Materials dar und sind im Organismus weit verbreitet. Sie werden von Epithel-, Muskel- und Endothelzellen synthetisiert und trennen die Zellen von unterliegendem Bindegewebsstroma. Elektronenoptisch unterscheidet man zwischen einer zellzugewandten Schicht, der Lamina rara, und einer elektronendichteren Schicht, der Lamina densa (Hay, 1977). Drei wichtige strukturelle Komponenten der Basalmembran konnten in den letzten Jahren isoliert und teilweise charakterisiert werden. Diese Komponenten sind das Glykoprotein Laminin (Timpl et al., 1979; Foidart et al., 1980) mit einem Molekulargewicht von ca. 900.000 und Heparansulfat-Proteoglykan (Kanwar und Farquar, 1979), die beide in der Lamina rara lokalisiert sind. Die Lamina densa hingegen besteht hauptsächlich aus kollagenem Protein (Abb.1). Die spezifische Wechselwirkung zwischen den Komponenten und ihre Verankerung mit dem interstitiellen Bindegewebe und den anliegenden Zellen sind noch weitgehend unklar. Zahlreiche biologische und klinische Untersuchungen haben gezeigt, daß Basalmembranen Schlüsselstrukturen bei Prozessen der Gewebeorganisation und des Stoffaustausches sind (Kefalides, 1973; Vracko, 1979). Über sie erfolgt die selektive Filtration nach Molekülgröße und Ionenladung im Nierenglomerulus (Kanwar und Farquar, 1979) oder der plazentare Stoffwechsel. Basalmembranen tauchen

als erste extrazelluläre Komponenten bei der Zelldifferenzierung auf (Leivo et al., 1980) und bilden eine Leitstruktur bei der Morphogenese (Ekblom et al., 1981) oder Geweberegeneration (Pierce, 1970). Viele entartete Zellen können erst dann metastasieren, wenn sie mit spezifischen Proteasen die Basalmembran durchbrochen und damit über die Zirkulation Zugang zu anderen Organen gefunden haben (Liotta et al., 1980). Darüberhinaus haben Basalmembranen die Fähigkeit, außerordentlichen Volumenschwankungen in den Blutgefäßen zu widerstehen, besitzen also elastische Eigenschaften. Die molekularen Grundlagen dieser zahlreichen biologischen Funktionen sind noch nicht bekannt.

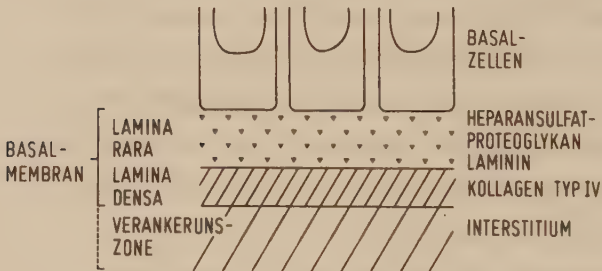


Abb.1 : Vereinfachtes Schema des Aufbaus einer Basalmembran und anliegender Strukturen

1.1. Größe und Struktur von Basalmembrankollagen

Basalmembrankollagen (Typ IV Kollagen) wurde zum ersten Mal von Kefalides (1971) aus boviner Linsenkapsel gewonnen. Er erhielt ein Pepsinfragment mit einem Molekulargewicht von ca. 110.000 und postulierte für tripelhelikales Basalmembrankollagen die Kettenzusammensetzung $(\alpha 1(IV))_3$. Verglichen mit den damals schon besser charakterisierten interstitiellen Kollagenen Typ I, II und III (Tab.1) fielen der hohe Gehalt an Hydroxyprolin (ca. 12%), Hydroxylysin (ca. 5%, meist verknüpft mit dem Disaccharid Glukosyl-Galaktose) sowie der relativ niedrige Gehalt an Alanin und Arginin auf. Seitdem wurde eine Reihe von Pepsinfragmenten des Typ IV Kollagens mit Molekulargewichten zwischen 15.000 und 160.000 aus Geweben wie Nierenglomeruli, Plazenta, Lunge und Tumoren erhalten (Miller, 1976; Kefalides et al., 1979; Bornstein und Sage, 1980; Glanville, 1981; Timpl und Martin, 1981).

Das gemeinsame Strukturprinzip interstitieller Kollagene ist eine starre Tripelhelix, die als rechtsgängige Superhelix aufgebaut ist und aus drei linksgängig gewundenen α -Ketten besteht. Sie bietet in nativem Zustand einen wirksamen Schutz der α -Ketten (MG etwa 100.000 bei ca. 1000 Aminosäuren und einer Länge von 290 nm) vor Abbau durch die meisten proteolytischen Enzyme. Voraussetzung für ihre Stabilität bildet auf Ebene der Sequenz das repetitive Aminosäuretriplett Gly-X-Y, wobei X und Y variable Aminosäuren bezeichnen. Der niedrige Glycingehalt

Tab. 1 : Bekannte Kollagentypen

Typ / Molekül	Strukturelle Charakteristika	Typische Gewebe
Typ I / $(\alpha 1(I))_2 \alpha 2(I)$, $(\alpha 1(I))_3$	dicke Fibrillen	Stützgewebe : Knochen, Haut
Typ II / $(\alpha 1(II))_3$	dünne Fibrillen	Knorpel
Typ III / $(\alpha 1(III))_3$	dünne Fibrillen	retikuläres Netzwerk, Gefäßwände
Typ IV / $\alpha 1(IV)$, 2(IV) ; $\alpha 3(IV)$ - Art der tripel- helikalen Organisation umstritten	nicht fibrillär, reguläres Netz- werk	Basalmembranen : Lamina Densa
Typ V / $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$ - unterschiedliche Art der Organisation in Tripelhelices	?	Exocytoskeleton : Epithelzellen , glatte Muskelzellen
Intima-/Endothelzellkolla- gen - distinkt v.Type I-V	?	Plazenta, Intima, Zellkulturen

(<33%) in Basalmembrankollagen sowie vorläufige Sequenzdaten (Schuppan et al., 1980; Rauter und Glanville, 1981) erhärteten die Vermutung, daß hier die repetitive Struktur Gly-X-Y von nicht-tripelhelikalen Bereichen verschiedener Ausdehnung unterbrochen wird. Eine derartige Unterbrechung wurde bisher nur in der tripelhelikalen Domäne der Komplementkomponente Clq gefunden und mit der elektronenmikroskopisch zu beobachtenden Flexibilität in diesen Domänen in Verbindung gebracht (Reid, 1979). Eine erhöhte Flexibilität konnte auch für größere native Segmente des Typ IV Kollagens mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden (Glanville et al., 1981).

Das Fehlen von Fibrillen in der Basalmembran ließen schon frühzeitig eine unterschiedliche quaternäre Organisation des Typ IV Kollagen im Vergleich zu den interstitiellen Kollagenen vermuten. Säureextraktion eines Basalmembran-tumors (EHS Sarkom, Orkin et al., 1977) erlaubte die Isolierung eines nahezu intakten Typ IV Kollagens mit einem Molekulargewicht der Ketten von ca. 150.000 (Timpl et al., 1978). Zellkulturuntersuchungen gaben Hinweise für die Biosynthese von Prokollagen-Typ IV, dessen Ketten ein Molekulargewicht von 170-180.000 besitzen, (Crouch und Bornstein, 1979; Tryggvason et al., 1980; Alitalo et al., 1980). Diese Vorläufermoleküle werden nach Ablagerung in der Matrix nur unwesentlich in ihrer Größe verändert (Minor et al., 1976; Heathcote et al., 1978). Da interstitielle Kollagene nicht-kollagene Domänen enthalten, war es nahelie-

gend, einen ähnlichen Aufbau für die Matrixform von Typ IV Kollagen anzunehmen.

Die Entdeckung einer kompakten, disulfidvernetzten Struktur mit Vierfachsymmetrie, genannt 7S-Kollagen (Risteli et al., 1980) sowie der Nachweis, daß diese Struktur mit der Tripelhelix von Typ IV Kollagen kovalent verknüpft ist (Kühn et al., 1981) führten kürzlich zum Vorschlag eines Netzwerkmodelles für Basalmembrankollagen (Timpl et al., 1981; Abb.2). Die monomeren Typ IV Kollagenmoleküle die-

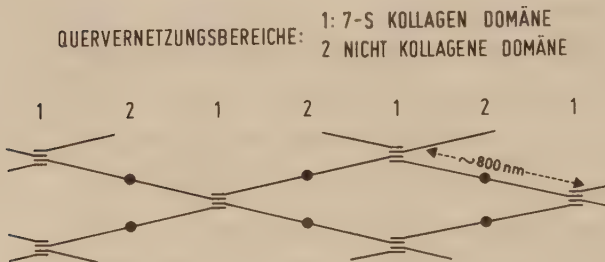


Abb.2 : Netzwerkmodell des Typ IV Kollagens

ses Netzwerkes bestehen aus zwei tripelhelikalen und zwei nicht-kollagenen Domänen (Abb.3). Das Netzwerk wird durch Verknüpfung von vier 7S-Kollagendomänen als auch von zwei nicht-kollagenen Domänen erzeugt. Zwischen beiden

Quervernetzungsseiten, die an den Enden des Moleküls liegen, befindet sich ein großer tripelhelikaler Bereich, der mit Einschluß eines kurzen nicht-kollagenen Segmentes NC2 ca. 330 nm lang ist. Das Molekulargewicht der Kettenfragmente dieses Abschnittes beträgt ca. 130.000 . Aus diesem Bereich wurde eine Vielzahl verschiedener Fragmente der $\alpha 1(\text{IV})$ und $\alpha 2(\text{IV})$ Kette charakterisiert (Bornstein und Sage, 1980).

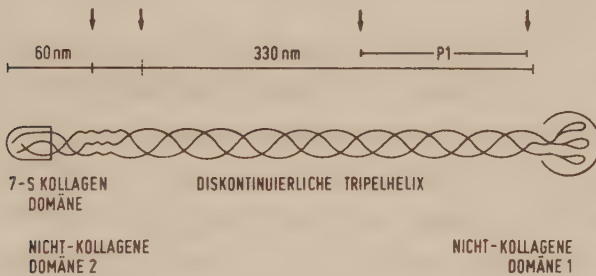


Abb.3 : Modell der monomeren Form des Basalmembrankollagens, welches extrazellulär zu dem in Abb.2 gezeigten Netzwerk verknüpft wird (Timpl et al., 1981) und vermutliche Lokalisierung des Fragmentes P1 . Pfeile markieren mögliche Spaltstellen für Pepsin.

Die Anordnung der zwei konstitutionellen Ketten im tripelhelikalen Molekül als $(\alpha 1(\text{IV}))_2\alpha 2(\text{IV})$ oder in der Form von

$(\alpha 1(IV))_3$ bzw. $(\alpha 2(IV))_3$ ist noch ungeklärt. Fragmente beider Ketten unterscheiden sich in Größe, Aminosäurezusammensetzung, Proteasesensibilität und ihrer Affinität gegenüber Ionenaustauschern. Hinweise für einen dritten Ketentyp, $\alpha 3(IV)$, in dem EHS-Sarkom wurden kürzlich in unserem Labor erhalten (Timpl et al., 1979; Schuppan, Diplomarbeit, 1979).

1.2. Fragmente der Tripelhelix von Basalmembrankollagen

Große Mengen von Basalmembrankollagen lassen sich aus dem EHS-Sarkom (Orkin et al., 1977), einem Basalmembran produzierenden Maustumor, gewinnen. Da die Tumormatrix nur einen geringen Anteil interstitieller Kollagene enthält, erwies sich die Reinigung der Pepsinfragmente des Typ IV Kollagens als verhältnismäßig einfach (Timpl et al., 1979). Durch Pepsinabbau entstehen aus $\alpha 1(IV)$ primär die Fragmente P1 (MG ca. 60.000) und P3A (MG ca. 70.000). Ein dem Maus-P1 analoges Fragment aus der bovinen Linsenkapsel*) konnte von Dixit und Kang (1979) isoliert werden. Ein den größten Teil der Tripelhelix umfassendes Fragment C' (MG ca. 130.000) ließ sich zusammen mit einem kürzeren Fragment C (MG ca. 95.000) aus boviner Linsenkapsel (Dixit und Kang, 1979) und humaner Plazenta (Rauter und Glanville, 1981) erhalten. C und P1 beinhalten wahrscheinlich das C-terminale

*) von Dixit und Kang (1979) als Fragment ALC-50K₁ bezeichnet

Ende des tripelhelikalen Bereiches, wie anhand eines gemeinsamen C-terminalen Bromcyanpeptides der verschiedenen großen $\alpha 1(IV)$ -Fragmente gezeigt werden konnte (Dixit und Kang, 1979; Schuppan et al., 1980; Abb.4). Dies illustrierte die Wichtigkeit peptidchemischer Arbeiten zur Klärung der makromolekularen Organisation. Aus dem EHS-Tumor stammen ferner die zuvor beschriebenen (Timpl et al., 1979; Schuppan, Diplomarbeit, 1979) und hier näher charakterisierten Pepsinfragmente P2 (aus $\alpha 2(IV)$) sowie $\alpha 3$ und P4 (aus $\alpha 3(IV)$).

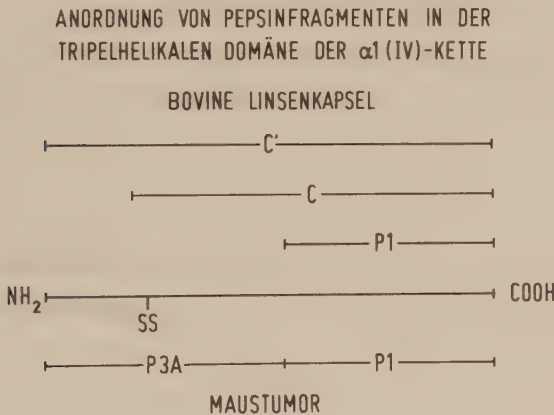


Abb.4 : Anordnung der Pepsinfragmente in der tripelhelikalen Domäne der $\alpha 1(IV)$ Kette. Die Zuordnung wurde möglich anhand eines gemeinsamen C-terminalen Bromcyanpeptides aus dem Basalmembrankollagen der bovinen LinsenkapSEL (Fragment C und C'; Dixit und Kang, 1979) und des EHS-Sarkoms (Fragment P1; Schuppan et al., 1980).

1.3. Ziele der Doktorarbeit

Aufgabe dieser Doktorarbeit war es, mehr Klarheit über die kovalente Struktur von Basalmembrankollagen zu gewinnen. Dabei wurden folgende Untersuchungen durchgeführt :

1.) Vergleich des Pepsinfragmentes P1 aus der $\alpha 1(\text{IV})$ Kette von Maustumor und Linsenkapsel

a.) Bestimmung der Anzahl und Isolierung der Spaltprodukte nach Abbau mit Bromcyan und Trypsin.

b.) Umfassende Sequenzanalyse der Fragmente zur Festlegung ihrer Reihenfolge und zum Nachweis von Unterbrechungen der Tripelhelix.

2.) Fragmentierungs- und Sequenzanalysen am Fragment P2 der $\alpha 2(\text{IV})$ Kette aus dem Maustumor. Dies sollte Informationen über den Grad der Homologie zwischen $\alpha 1(\text{IV})$ und $\alpha 2(\text{IV})$ liefern.

3.) Charakterisierung von Pepsinfragmenten aus dem Maustumor, die weder der $\alpha 1(\text{IV})$ noch der $\alpha 2(\text{IV})$ Kette zugeordnet werden können. Weitere Fragmentierung sollte ihre Herkunft von einem dritten Kettentyp, $\alpha 3(\text{IV})$, belegen.

2. Ergebnisse

2.1. Isolierung von Pepsinfragmenten der $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$ und $\alpha 3(\text{IV})$ Kette

Einzelheiten der Gewinnung distinkter Pepsinfragmente des Basalmembrankollagens aus dem vorextrahierten Tumorgewebe wurden bereits von Timpl et al. (1979) und in der vorangegangenen Diplomarbeit (Schuppan, 1979) beschrieben. Deshalb sollen die wichtigsten Schritte der Isolierung nur kurz skizziert werden (s. auch Abb.30 unter Methoden). Pepsinabbau über Nacht bei pH 2.5/15° bringt die Hauptmenge des Kollagens in Lösung, da nur ca. 10% des Hydroxyprolins im Rückstand verbleiben. Das Präzipitat einer 10%-igen NaCl-Fällung aus dem Überstand wurde in Tris-Puffer bei pH 7.4 gelöst und fraktioniert mit 1.3M, 1.6M und 2M NaCl gefällt. Der überwiegende Teil des Basalmembrankollagen wurde zwischen 1.3M und 2M NaCl erhalten. Eine Disk-Elektrophorese zeigte, daß zwischen 1.3M und 1.6M NaCl hauptsächlich Fragmente der $\alpha 1(\text{IV})$ und $\alpha 3(\text{IV})$ Kette präzipitieren (P1, P3A und P4, $\alpha 3$), zwischen 1.6M und 2M NaCl dagegen Fragmente der $\alpha 2(\text{IV})$ Kette überwiegen (P2, P3B, P3C) - s. Abb.5. Da alle Operationen bei bzw. unter 15° ausgeführt wurden, d.h. die Fragmente vermutlich noch tripelhelikal waren, ist dies ein Hinweis für die Herkunft der $\alpha 1(\text{IV})$ und $\alpha 2(\text{IV})$ Kettenfragmente aus unterschiedlichen tripelhelikalen Molekülen. Pepsinabbau bei pH 2.0 führt zwar zu höherer Aus-

beute an $\alpha 1(\text{IV})$ -Fragmenten sowie P3C (aus $\alpha 2(\text{IV})$) und P4/ $\alpha 3$ (aus $\alpha 3(\text{IV})$), zerstört aber weitgehend P2 und P3B (aus $\alpha 2(\text{IV})$). Wird der Abbau bei pH 3.0 durchgeführt, steigt die relative Ausbeute an P2 und P3B, insgesamt geht aber nur eine geringere Menge des Kollagens in Lösung.

KONSTITUIERENDE KETTE	PEPSINFRAGMENTE	
	Cysteinfrei	Intermolekular disulfid- vernetzt
$\alpha 1(\text{IV})$	P1 (55.000)	P3A (72.000)
$\alpha 2(\text{IV})$	P2 (50.000)	P3B (44.000), P3C (27.000)
$\alpha 3(\text{IV})$	P4 (40.000) P4' (46.000)	$\alpha 3$ (100.000), enthält P4 und P4'

Abb.5 : Die hauptsächlichen Pepsinfragmente des Maus Typ IV Kollagens (nach Timpl et al., 1979, und der vorliegenden Doktorarbeit). Angabe der per Disk-Elektrophorese geschätzten Molekulargewichte in Klammern.

Die durch fraktionierte Fällung angereicherten Fragmentgemische wurden unter denaturierenden Bedingungen über Agarose A 1.5M in ein Gemisch hochmolekularer, disulfidvernetzter Fragmente und ein Gemisch niedermolekularer, cysteinfreier Fragmente aufgetrennt. Letztere Fraktion

enthielt P1, P2 und P4, die an CM-Zellulose (P1 und P4 von P2) und an DEAE-Zellulose (P1 von P4) voneinander in einer per Disk-Elektrophorese und Aminosäureanalyse geschätzten Reinheit von 90% separiert werden konnten. Fragment $\alpha 3$ (aus $\alpha 3(IV)$) wurde nach Reduktion und Alkylierung des hochmolekularen Materials durch zweimalige Chromatographie über Agarose A5m zu ca. 85% angereichert.

2.2. Reihenfolge und teilweise Aminosäuresequenz von Bromcyan- und tryptischen Peptiden des Fragmentes P1 aus der $\alpha 1(IV)$ Kette des Maustumors

2.2.1. Reinigung und Eigenschaften der Bromcyanpeptide

Fragment P1 (100-200mg) aus verschiedenen Abbauansätzen wurde mit BrCN gespalten. Andere Autoren (Kresina und Miller, 1979) haben gezeigt, daß in Basalmembrankollagen Methionin zum Teil in Form eines Sulfons oder Sulfoxids vorliegt und mit BrCN nicht spaltbar ist. Deshalb wurde Methionin vor der Spaltung durch Reduktion mit Merkaptoäthanol zumindest partiell regeneriert. Nach Chromatographie über Sephadex G75 konnte ein reproduzierbares Muster von 10 Bromcyanpeptiden erhalten werden. Drei der Fraktionen in Abb.6 enthielten jeweils zwei Peptide. Durch Phosphozellulosechromatographie konnten sämtliche Peptide voneinander separiert werden. Zusammensetzung, Sequenz und Reihenfolge der kleinen Peptide CB8 und CB9, die mit dem zugesetzten tritierten Wasser (THO)

erscheinen, waren bereits durch N-terminale Sequenzierung von P1 bekannt und wurden nicht weiter untersucht.

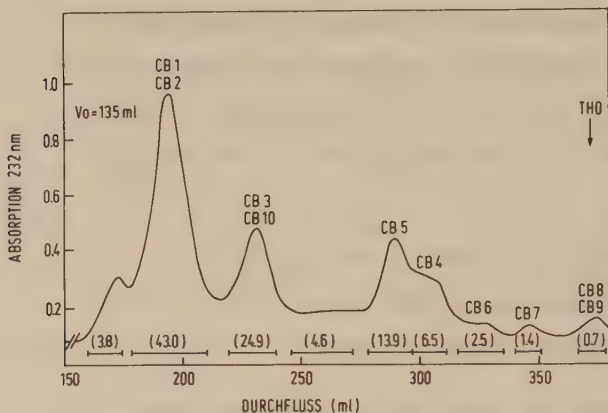


Abb.6 : Chromatogramm der BrCN-Peptide von Fragment P1 über Sephadex G75 in 0.2M NH_4HCO_3 pH 7.9 .Säulenmaße 110x2.6 cm, Durchfluß 20 ml/h. Das Ausschlußvolumen (V_o) und das Elutionsvolumen triitierten Wassers (THO als Totalvolumen) markieren den Trennbereich der Säule. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen BrCN-Peptide sind oben, die prozentualen Ausbeuten, bezogen auf 100% Gesamtausbeute, unten in Klammern angegeben.

Die Abbildungen 7-9 illustrieren die Reinigung der einzelnen Fraktionen über Phosphozellulose. Dabei wurden Fraktionen von sehr homogenen Peptiden erhalten, die eine Sequenzierung bis zu 60 Schritten erlaubten (z.B. CB10).

Zwischen zwei homogenen Peptiden liegende Fraktionen stellten häufig ein Gemisch beider Peptide dar (s. z.B. Abb.7 und 9). Das Auftreten solcher Fraktionen ist möglicherweise auf geringe Unterschiede im Hydroxylierungsgrad der Lysinreste dieser Peptide zurückzuführen. Weitere Reinigungsschritte über Sephadex G50 oder Biogel P4 führten zur Auftrennung von acht Bromcyanpeptiden, die in etwa stöchiometrischen Proportionen vorlagen. Jedes Peptid besitzt eine distinkte Aminosäurezusammensetzung.

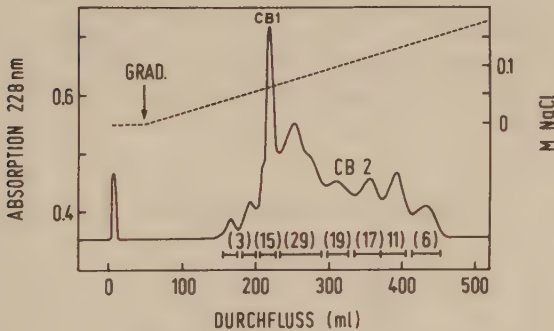


Abb.7 : Trennung der Peptide CB1 und CB2 über Phosphocellulose. Gradient (grad, gestrichelte Linie) 0-0.3M NaCl. Elution der Peptide in 5mM Na-Azetat pH 3.6 . Auftrag bei 0 ml, Durchfluß 40 ml pro h, Säulenmaße 1.5x10 cm. Fraktionen intermediärer Zusammensetzung wurden nicht bezeichnet. Relative Ausbeuten (bezogen auf 100% Gesamtausbeute) in Klammern.

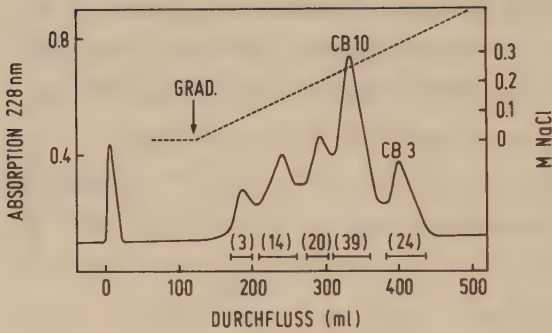


Abb.8 : Trennung der Peptide CB3 und CB10 über Phospho-
zellulose. Gradient (grad, gestrichelte Linie)
0-0.5M NaCl. Sonst Bedingungen wie in Abb.7 .

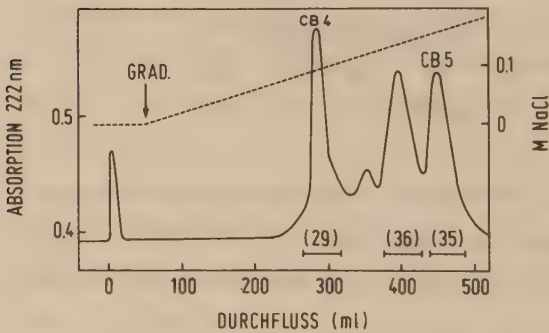


Abb.9 : Trennung der Peptide CB4 und CB5 über Phospho-
zellulose. Gradient (grad, gestrichelte Linie)
0-0.3M NaCl. Sonst Bedingungen wie in Abb.7 .

Die durch Molekularsiebchromatographie und Aminosäureanalyse ermittelten Molekulargewichte sind in guter Übereinstimmung. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß die Summe der Zusammensetzungen der BrCN-Peptide der von Fragment P1 sehr nahe kommt. Legt man ein mittleres Molekulargewicht pro Aminosäure von 98 zu Grunde, so errechnet sich bei 527 Aminosäuren und ca. 10% Kohlenhydratanteil in P1 (Timpl et al., 1979) ein Molekulargewicht von etwa 57.000. Das entspricht recht gut einem Molekulargewicht von 60.000 wie es mittels Disk-Elektrophorese für Fragment P1 bestimmt werden konnte.

Die Größe der BrCN-Peptide liegt zwischen 141 (CB1) und 3 (CB9) Aminosäuren. Bemerkenswert ist das Auftreten von 3-Hydroxyprolin in zwei Peptiden (CB1 und CB5). Peptid CB1 enthält ferner das einzige Tyrosin. Peptid CB7 (13 Reste) besitzt kein Homoserin und stellt somit das C-terminale Fragment dar. Sequenzanalyse von Fragment P1 legte bereits die Reihenfolge der kleinen Peptide CB8 (4 Reste) und CB9 (3 Reste) als auch von CB3 (70 Reste) fest. Die Aufeinanderfolge der verbleibenden Peptide CB1, CB2, CB4, CB5, CB6 und CB10 konnte also nur durch zusätzliche Spaltungen bestimmt werden. Größe und Reihenfolge derartiger Fragmente sind der besseren Übersicht wegen schon in Abb.10 gezeigt. Trotz vorangegangener Reduktion mit Merkaptoäthanol konnten kleinere Mengen ungespaltener Peptide gefunden werden. Insbesondere ähnelt so das Material in der Schulter vor CB1

und CB2 in Abb.6 in der Zusammensetzung einem Peptid CB3-10, das vor CB5 einem Peptid CB4-6. Die Mengen in diesen Fraktionen waren größer, wenn Fragment P1 vor der Spaltung nicht reduziert worden war.

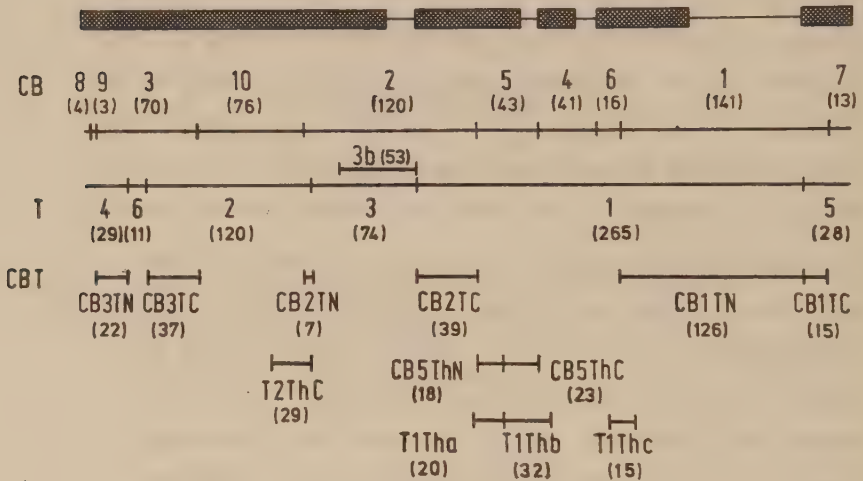


Abb. 10 : Reihenfolge der BrCN-(CB) und der tryptischen(T)

Peptide in Fragment P1. Weitere durch Nachspaltungen (s.u.) erhaltene Schlüsselpptide und ihre relativen Positionen in P1 sind darunter aufgeführt. Der jeweilige Gehalt an Aminosäuren ist in Klammern angegeben. Schraffierte Bereiche im oberen Teil des Schemas stellen die durch Sequenzanalyse abgedeckten Abschnitte dar. Insgesamt wurden ca. 70% der Sequenzpositionen von P1 bestimmt.

Tab.2 : Aminosäurezusammensetzung von Fragment P1 aus Maustumor und seinen Bromcyanpeptiden

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8 CB9	CB10	Summe	P1
3-Hydroxyprolin	1	-	-	-	0.3	-	-	-	-	1.3	1
4-Hydroxyprolin	18	14	7	5	5	2	2	-	11	64	65
Asparaginsäure	6	5	5	4	2	1	1	1	3	28	29
Threonin	2	2	3	-	1	1	1	-	1	11	10
Serin	4	10	5	2	1	2	2	1	6	33	33
Glutaminsäure	15	10	7	3	6	-	-	-	8	49	49
Prolin	14	5	5	4	7	-	1	-	1	37	39
Glycin	45	41	23	13	13	6	3	1	26	171	171
Alanin	2	4	1	1	-	-	-	-	3	11	12
Valin	8	5	2	1	1	-	1	1	2	21	20
Methionin	1	1	1	1	1	1	-	2	1	9	6
Isoleucin	1	3	1	1	-	2	-	-	3	11	11
Leucin	10	5	2	1	2	-	-	-	3	23	24
Tyrosin	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Phenylalanin	4	4	-	2	-	-	1	-	1	12	13
Histidin	-	1	1	-	2	-	1	1	-	6	6
Hydroxylisin	7.5	7.5	5	3	2	1	-	-	6	32	31
Lysin	0.5	0.5	1	-	-	-	-	-	-	2	3
Arginin	1	2	1	-	-	-	-	-	1	5	6
Insgesamt	141	120	70	41	43	16	13	7	76	527	530

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin als Homoserin bestimmt (ausgenommen P1).

2.2.2. Reinigung und Eigenschaften der tryptischen Peptide

Die Reihenfolge der BrCN-Peptide aus dem zentralen Bereich von Fragment P1 ließ sich nur durch eine Spaltung an anderen Stellen der Sequenz und die Charakterisierung methioninhaltiger, d.h. überlappender Segmente finden. Wegen des niedrigen Arginin- bzw. Lysingehaltes (7-9 Reste, Tab.2) von P1 versprach eine Trypsinspaltung Erfolg. Das Profil der tryptischen Peptide nach Chromatographie über Sephadex G75 (Abb.11) war reproduzierbar und erlaubte die Separierung von sechs hauptsächlich auftretenden Peptiden T1 bis T6 in etwa stöchiometrischen Verhältnissen.

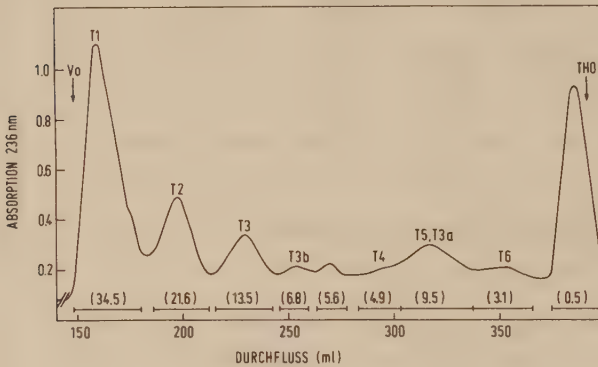


Abb.11 : Chromatogramm der tryptischen Peptide von P1 über Sephadex G75 . Bedingungen wie in Abb.6 angegeben. V_o =Ausschlußvolumen, THO=Totalvolumen der Säule. Relative Ausbeuten der tryptischen(T) Peptide (in Prozent) in Klammern.

Diese Peptide wurden durch Chromatographie über Phosphocellulose, Sephadex G50 oder Biogel P4 gereinigt. Die Summe ihrer Aminosäurezusammensetzungen entspricht derjenigen von P1 (Tab.3). Die Anzahl der Aminosäuren reicht von 265 (in T1) bis 11 (in T6) und stimmt mit den über Sephadex G75 geschätzten Molekulargewichten überein. Zwei der Peptide, T3 (74 Reste) und das Lysinpeptid T6 (11 Reste) enthalten kein Methionin, müssen also aus zentralen Bereichen von BrCN-Peptiden stammen. Eines der beiden Arginine in T2 (120 Reste) läßt sich wegen einer Arg-Hyp-Bindung nicht spalten, wie auch im folgenden Abschnitt bestätigt wird.

Kleinere Mengen des Materials eluieren an Sephadex G75 zwischen den Peptiden T3 und T6 (Abb.11) und enthalten Bruchstücke, die durch weitere Spaltung aus den größeren Peptiden entstanden sind. Sie besitzen teilweise ein C-terminales Lysin. Offenbar wird ein Teil der Lysinreste im Laufe der posttranslationalen Modifikation des Kollagenmoleküls weniger vollständig hydroxyliert; denn Spaltungen an Hydroxylysin wurden nicht beobachtet (s.auch Wu et al., 1981). So stammen T3a (21 Reste mit C-terminalem Lysin) und T3b (53 Reste) aus T3 (74 Reste). Spaltprodukte aus T1 wurden über die Fraktionen T2 bis T4 verteilt gefunden. Die Heterogenität war besonders augenscheinlich für die Fraktion, die als Hauptkomponente das C-terminale Peptid T5 (28 Reste, besitzt we-

der Arg noch Lys, Tab.3), sich an Phosphozellulose jedoch noch in sechs weitere Fragmente auftrennen ließ (Abb.12).

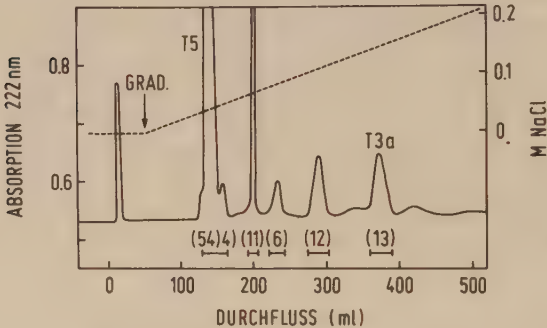


Abb.12 : Auftrennung der Peptid T5 enthaltenden Fraktion aus der Molekularsiebchromatographie (s.Abb.11) über Phosphozellulose. Gradient (grad, gestrichelte Linie) 0-0.3M NaCl. Elution der Peptide in 5mM Na-Azetat pH 3.6 . Auftrag bei 0 ml, Durchfluß 40 ml/h, Säulenmaße 1.5x10 cm. Nicht bezeichnete Fraktionen enthielten u.a. Fragmente aus Peptid T1 . Relative Ausbeuten (bezogen auf 100% Gesamtausbeute) in Klammern.

Einige dieser zusätzlichen Fragmente, wie z.B. T3b, erwiesen sich als hilfreich bei der Sequenzanalyse.

2.2.3. Nachspaltung von Bromcyan- und tryptischen Peptiden

Die Peptide CB1 (141 Reste), CB2 (120 Reste), CB3 (70 Reste) und CB10 (76 Reste) enthalten je ein bzw. zwei (CB2) Reste von Arginin, CB3 zusätzlich ein Lysin. Je 1-5mg der Peptide wurden unter den gleichen Bedingungen wie P1 mit Trypsin behandelt und über Biogel P10 oder Sephadex G50 chromatographiert. CB1 zerfällt in das N-terminale Peptid CB1TN (126 Reste) und das C-terminale, Homoserin enthaltende Fragment CB1TC (15 Reste). CB3 wird in CB3TN (22 Reste) und CB3TC (37 Reste) sowie das zentrale Lysinpeptid T6 (11 Reste), CB2 in CB2TN (7 Reste), CB2TC (39 Reste) und das zentrale Argininpeptid T3 (74 Reste) gespalten. Diese Ergebnisse sind in Tab.4 zusammengefaßt. Sequenzdaten, Aminosäureanalysen und chromatographische Molekulargewichtsbestimmungen stehen in Einklang mit den erwarteten Positionen der einzelnen Peptide. Das Arginin in CB10 erwies sich trotz drastischerer Abbaubedingungen (10h bei 37°) als nicht spaltbar, analog dem Befund für Peptid T2 (s.o.).

Die methioninhaltigen tryptischen Peptide T1, T2, T4 und T5 konnten nach Reduktion mit Merkaptoäthanol durch BrCN nachgespalten werden (Mengen von 2-15mg). Die Separierung dieser TCB-Peptide gelang über Sephadex G75 (T1, T2), Sephadex G50 (T5) oder Biogel P4 (T4). Heterogene Molekularsiebfraktionen wurden schließlich über Phosphozellulose aufgetrennt und erlaubten die Zuordnung

Tab. 3 : Zusammensetzung von Fragment P1 aus Maustumor und seinen tryptischen Peptiden sowie einiger N-terminaler (TN) und C-terminaler (TC) Peptide aus tryptischen Spaltungen von Bromcyanpeptiden

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Summe	P1	CB1 TC	CB2 TN	CB2 TC	CB3 TN
3-Hydroxyprolin	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-	-
4-Hydroxyprolin	33	17	9	0.5	5	2.5	67	65	3	2	4.5	-
Asparaginsäure	13	5	4	3	2	1	28	29	1	-	1	2
Threonin	4	2	2	1	1	1	11	10	-	-	-	1
Serin	8	10	5	3	2	-	28	33	1	1	4	2
Glutaminsäure	28	11	7	4	-	-	50	49	-	-	3	4
Prolin	25	6	4	1	3	0.5	39	39	1	1	0.5	1
Glycin	87	40	24	8	8	4	171	171	5	2	13	7
Alanin	4	4	3	-	-	-	11	12	-	-	1	-
Valin	12	3	3	1	1	1	21	20	-	-	2	-
Methionin	4	2	-	1	1	-	8	6	1	-	1	-
Isoleucin	5	3	2	1	-	-	11	11	-	-	1	-
Leucin	13	5	4	-	1	-	22	24	1	-	1	-
Tyrosin	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
Phenylalanin	9	1	-	-	2	-	12	13	1	-	4	-
Histidin	2	1	1	1	1	-	6	6	-	-	-	-
Hydroxylysin	16	7.5	5	3	-	-	31.5	31	-	-	3	3
Lysin	0.5	0.5	0.4	0.3	-	1	2.5	3	-	-	-	-
Arginin	1	2	1	1	-	-	5	6	-	1	-	1
Insgesamt	265	120	74	29	28	11	527	530	15	7	39	22

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin in den BrCN-Peptiden als Homoserin bestimmt.

Tab. 4 : Die tryptischen Peptide von Fragment Pl aus Maustumor verglichen mit den aus den jeweiligen

Bromcyanpeptiden erhaltenen tryptischen Spaltprodukten

	CB8 CB9	CB3 TN	Summe = T4	CB3 TC	CB10	CB2 TN	Summe = T2	T3a	T3b	Summe = T3
3-Hydroxyprolin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxyprolin	-	-	0.5	5	11	2	18	4	5	9
Asparaginsäure	1	2	3	2	3	-	5	2	2	4
Threonin	-	1	1	1	1	-	2	-	2	2
Serin	1	2	3	3	6	1	10	2	3	5
Glutaminsäure	-	4	4	3	8	-	11	1	6	7
Prolin	-	1	1	3	1	1	5	1	3	4
Glycin	1	7	8	12	26	2	40	6	18	24
Alanin	-	-	-	1	3	-	4	-	3	3
Valin	1	-	1	1	2	-	3	-	3	3
Methionin	2	-	2	1	1	-	2	-	-	-
Isoleucin	-	1	1	-	3	-	3	1	1	2
Leucin	-	-	-	2	3	-	5	1	3	4
Phenylalanin	-	-	-	-	1	-	1	-	0.3	0.3
Histidin	1	-	-	1	-	-	1	1	-	1
Hydroxylysin	-	3	3	2	6	-	8	1	3	4
Lysin	-	-	0.5	-	-	-	-	1	-	1
Arginin	-	1	1	-	1	1	2	-	1	1
Insgesamt	7	22	29	37	76	7	120	21	53	74

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin in den BrCN-Peptiden als Homoserin bestimmt.

* mit Ausnahme von T3 und der nicht mit Trypsin spaltbaren BrCN-Peptide

Tab. 4 : Fortsetzung

	CB2 TC	CB5	CB4	CB6	CB1 TN	Summe = T1	CB1 TC	CB7	Summe = T5
3-Hydroxyprolin	-	0.3	-	-	-	0.3	1	-	1
4-Hydroxyprolin	4.5	5	5	2	15	31.5	3	2	5
Asparaginsäure	1	2	4	1	5	13	1	1	2
Threonin	-	1	-	1	2	4	-	1	1
Serin	4	1	2	2	2	11	1	2	3
Glutaminsäure	3	6	3	-	15	27	-	-	-
Prolin	0.5	7	4	-	14	25.5	1	1	2
Glycin	13	13	13	6	41	85	5	3	8
Alanin	1	-	1	-	2	4	-	-	-
Valin	2	1	1	-	8	12	-	1	1
Methionin	1	1	1	1	-	4	1	-	1
Isoleucin	1	-	1	2	1	5	-	-	-
Leucin	1	2	1	-	9	13	1	-	1
Tyrosin	-	-	-	-	1	1	-	-	-
Phenylalanin	4	-	2	-	3	9	1	1	2
Histidin	-	2	-	-	-	2	-	1	1
Hydroxylysin	3	2	3	1	7	16	-	-	-
Lysin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginin	-	-	-	-	1	1	-	-	-
Insgesamt	39	43	41	16	126	265	15	13	28

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin in den BrCN-Peptiden als Homoserin bestimmt.
 Die Summe bezieht sich auf die Addition der zuvor aufgeführten Fragmente; die so erhaltene Zusammensetzung ist mit der des Ausgangsmaterials (T4, T2, T3, T1 und T5) verglichen

zu den Fragmenten, die durch tryptische Nachspaltungen der BrCN-Peptide erhalten wurden (s.Tab.4 und 5). Aus T4 (29 Reste) entstehen die Peptide CB8 (4 Reste) und CB9 (3 Reste) sowie CB3TN (22 Reste). Die Aufeinanderfolge CB8-9-3 war schon durch die N-terminalen Sequenzdaten von P1 gesichert. Aus T2 (120 Reste) dagegen wurden CB3TC (37 Reste), CB10 (76 Reste) und CB2TN (7 Reste) erhalten. Daraus läßt sich die Reihenfolge CB8-9-3-10-2 ableiten. T1 (265 Reste) liefert ein komplexeres Chromatogramm (Abb.13) mit den Peptiden CB2TC (39 Reste), CB4 (41 Reste), CB5 (43 Reste), CB6 (16 Reste) und CB1TN (126 Reste) und ergänzt das Schema der Reihenfolge zu CB8-9-3-10-2-,4,5,6,-1 .

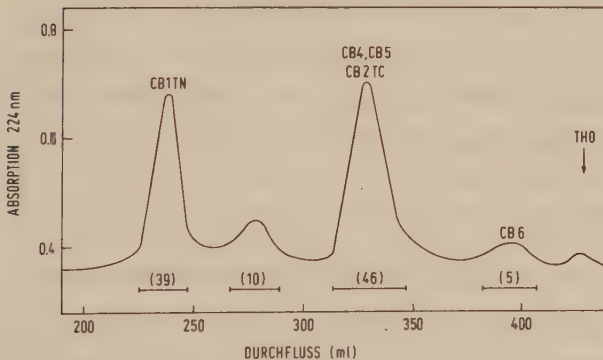


Abb.13 : Chromatogramm des mit BrCN nachgespaltenen Peptides T1 über Sephadex G75 . Bedingungen wie in Abb. 6 angegeben. V_o = Ausschlußvolumen, THO = Totalvolumen der Säule. Relative Ausbeuten (in %) in Klammern.

Den C-terminus beschließt Peptid T5 (28 Reste), das erwarteterweise durch Nachspaltung in CB1TC (15 Reste) und CB7 (13 Reste) zerlegt werden konnte. Die Reihenfolge CB8-9-3-10-2-,4,5,6,-1-7 konnte durch Sequenzanalyse bestätigt werden (s.Abb.10 und 17).

2.2.4. Spaltung einzelner Bromcyanpeptide mit Thermolysin

Um die noch offene Frage der Anordnung von CB4, CB5 und CB6 in P1 zu klären, wurden je 0.5-5mg Peptid CB1, CB2, CB4 und CB5 mit Thermolysin inkubiert und die Abbaugemische über Sephadex G50 bzw. Phosphozellulose (im Falle von CB5) separiert. Unter anderen wurden dabei von CB1 N-terminale Peptide verschiedener Größe, von CB2 ein C-terminales Dipeptid (neben einem Tetrapeptid) CB2ThC erhalten. CB5 wurde in zwei Peptide etwa gleicher Größe, CB5ThN (18 Reste) und CB5ThC (25 Reste), gespalten. Peptid CB4 dagegen besitzt multiple Spaltstellen, ermöglicht aber die Gewinnung des N-terminalen Peptides CB4ThN (7 Reste) in guter Ausbeute.

2.2.5. Spaltung von Peptid T1 mit Thermolysin

Mengen von 3-10mg T1 wurden mehrmals unter gleichen Bedingungen mit Thermolysin gespalten und die resultierenden Peptide über Sephadex G75 in sechs Fraktionen aufgetrennt (Abb.14), die sämtlich mehrere Peptide enthielten und über Phosphozellulose rechromatographiert werden mußten. Eine abschließende Reinigung erfolgte dann mittels

HPLC (Abb.15). Dabei wurden hauptsächlich folgende methioninhaltige Peptide erhalten : T1Tha (20 Reste), T1Thb (32 Reste) und T1Thc (15 Reste). Die Aminosäurezusammensetzungen der Fragmente, die für spätere Sequenzierungen wichtig waren, sind in Tab.5 zusammengefaßt.

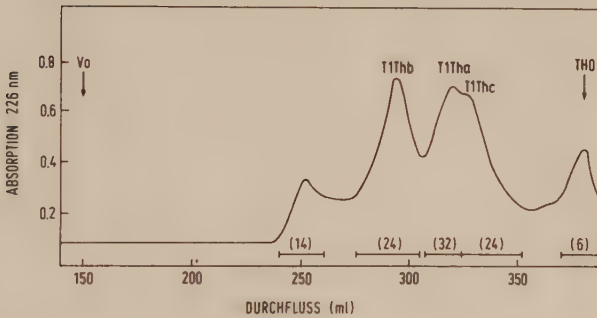


Abb.14 : Chromatographie der thermolytischen Peptide von Fragment T1 über Sephadex G75 . Unter Bedingungen wie in Abb.6 angegeben.. V_o =Ausschlußvolumen, TH0= Totalvolumen der Säule. Relative Ausbeuten (Prozent der Gesamtausbeute) in Klammern.

Peptid T1Tha und T1Thb wurden mit Bromcyan nachgespalten. Schon die Aminosäureanalyse dieser Spaltpeptide erlaubte neben der Sequenzanalyse die Festlegung der Reihenfolge CB2-5-4 und indirekt CB4-6-1 (Tab.5).

2.2.6. Spaltung von Peptid T2 mit Thermolysin

Peptid T2 ließ sich durch eine milde Behandlung mit Thermolysin im Verhältnis 1:1000 (Enzym : Substrat) spezifisch an den N-Termini der Leucinreste in den Positionen 58, 114 und 132 (s.Abb.17) in vier Peptide zerlegen. Diese Peptide wurden durch Chromatographie an Sephadex G50 gereinigt. Das Peptid T2ThC (29 Reste, Tab.5) ermöglichte den direkten Beweis für den Übergang CB10-CB2 und darüberhinaus die durchgehende Sequenzierung von Fragment P1 bis Position 215 (s.Abb.17).

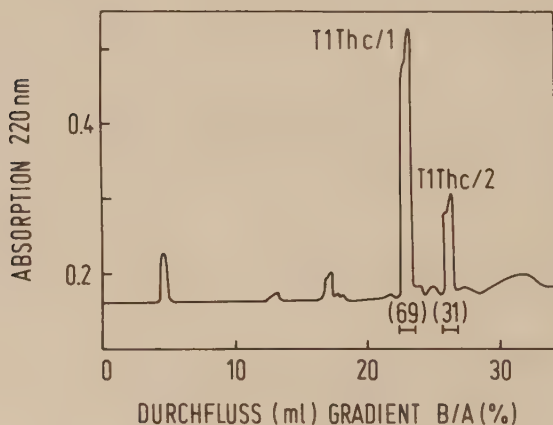


Abb.15 : Reinigung der über Sephadex G75 und Phosphozellulose gewonnenen Fraktion T1Thc mittels HPLC. Frakt.T1Thc/2 enthielt das in Tab.5 als T1Thc bezeichnete Fragment. Säule Vidac TP18, Durchfluß 1ml/min bei 55°. Phase A: 5mM Ammoniumazetat pH 6.5 ; Phase B: wie A mit 80% Azetonitril. Anstieg B/A 1% pro min. Relative Ausbeuten (in % der Gesamtausbeute) in Klammern.

Tab. 5 : Zusammensetzung ausgewählter thermolytischer Peptide aus Nachspaltungen
von CB2, CB4, CB5, T1 und T2

	CB2 ThC	CB4 ThN	CB5 ThN	CB5 ThC	T1 Tha	T1 Thb	T1 Thc	T2 ThC
3-Hydroxyprolin	-	-	0.3	-	0.3	-	-	-
4-Hydroxyprolin	-	2	3.5	2	3.5	4	2	5
Asparaginsäure	-	-	-	2	-	2	1	-
Threonin	-	-	1	-	1	-	1	1
Serin	(1)	-	-	1	-	1	1	3
Glutaminsäure	-	-	2	4	2	4	-	2
Prolin	-	1	3.2	3	3.2	4	-	1
Glycin	(1)	3	6	7	6	10	5	9
Alanin	-	-	-	-	-	-	-	2
Valin	-	-	-	1	-	1	1	-
Methionin	1	-	-	1	1	1	1	1
Isoleucin	-	-	-	-	-	-	1	-
Leucin	-	-	1	1	1	1	1	1
Phenylalanin	1	1	-	-	1	1	-	1
Histidin	-	-	1	1	1	1	-	-
Hydroxylysin	-	-	-	2	-	2	1	2
Arginin	-	-	-	-	-	-	-	1
Insgesamt	2(4)	7	18	25	20	32	15	29

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin in den BrCN-Peptiden als Homoserin bestimmt. Zur Lokalisation der einzelnen Peptide vgl. Abb. 10 u. Abb. 17.

2.2.7. Sequenzanalyse und Primärstruktur von Fragment P1 aus dem Maustumor

Fragment P1 und die verschiedenen Peptide wurden der N-terminalen Sequenzanalyse nach Edman unterworfen (Edman und Begg, 1967; Lottspeich, 1980; Rauter und Glanville, 1981). In einigen Peptiden, z.B. CB10, konnten bei Mengen von 6-150 nmol bis zu 60 Positionen identifiziert werden. Das weist auf einen hohen Reinheitsgrad der meisten Peptide hin. Kleine C-terminale Bereiche (2-4 Aminosäuren) wurden außerdem durch Spaltung mit Carboxypeptidase Y bestimmt (CB1TN, CB2TC, CB5, CB7 und T2). Insgesamt konnten 70% der Sequenzpositionen in P1 identifiziert werden (Abb.17).

Abb.10 veranschaulicht die Länge der sequenzierten Bereiche und ihre Positionen in P1. Über Methionin hinausgehende, überlappende Sequenzen wurden mit P1 (CB8-9-3), T2 (CB3-10), T5 (CB1-7), T1Tha (CB2-5) und T2ThC (CB10-2) erhalten. In anderen Fällen, so z.B. mit T1Thb (CB5-4), ließ sich der N-Terminus des überlappenden Peptides und, nach erfolgter Spaltung mit BrCN, das C-terminale Peptid (hier CB4TN) sequenzieren. Der Übergang CB4-CB6 konnte indirekt durch das Peptid T1Thc gesichert werden. Die sieben N-terminalen der insgesamt 15 Reste begannen in der Mitte von Peptid CB6; die verbleibenden Reste ließen sich anhand der Aminosäureanalyse von T1Thc (Tab.5) nur dem N-Terminus von Peptid CB1 zuordnen.

Die in ihrer Primärstruktur noch unbekannten Bereiche in P1 sind gut durch eine Anzahl kleinerer, meist thermolytischer (für CB1) oder tryptischer (für CB2) Peptide definiert. So konzentrieren sich fünf Valinreste in der Mitte von CB1 (um Pos. 425), drei Phenylalanine nahe dem C-Terminus von CB1TN (um Pos. 485) und der einzige Tyrosinrest liegt etwa bei Position 445 .

Einige der Aminosäuren ließen sich trotz ihres frühen Auftretens in der Sequenz und der großen Reinheit der Präparate auch bei wiederholtem Edman-Abbau nicht identifizieren. So enthält der Anfangsbereich von CB3, abgedeckt durch das Fragment T4 (22 Reste), drei Reste Hydroxylysin; die Sequenzanalyse dagegen zeigt Leerpositionen in 8, 11, 17 und 26 (in Abb.17 mit einem X bezeichnet). Da die Hydroxylysinreste fast vollständig glykosyliert sind (Kefalides, 1971) und während des Edman-Abbaus ihre Anilinothiazolinon (ATZ)-Derivate hydrophilen Charakter haben, verbleiben sie vornehmlich vor der Konvertierung in der wässrigen Phase und gehen dadurch in dem automatischen Sequenzierungsablauf verloren. Die ATZ-Derivate der anderen Aminosäuren sind dagegen mit Butylchlorid extrahierbar.

3-Hydroxyprolin konnte in den Peptiden CB1TC (90% Hydroxylierung in Pos. 504) und CB5 (30% Hydroxylierung in Pos. 275) lokalisiert werden. Das Phenylthiohydantoin (PTH)-

Signal der Position 504 über HPLC ist im Vergleich zu dem des Prolin- oder Hydroxyprolin-PTH stark aufgespalten und ähnelt zum Teil dem eines Serin (Abb.16). Die Rückhydrolyse des Derivates in 6N HCl erlaubte trotz der beobachteten weitgehenden Zerstörung von Hydroxyprolinresten eine Zuordnung des Signals zu 3-Hydroxyprolin.

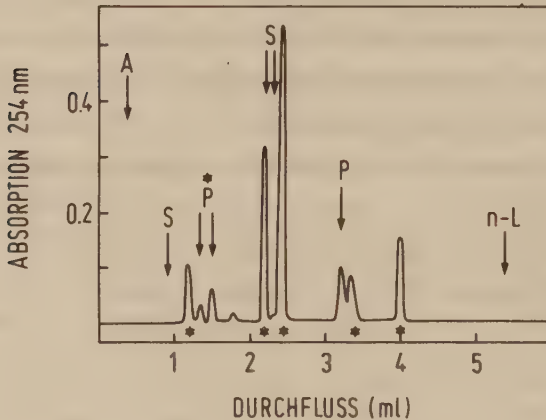


Abb.16 : HPLC-Profil des Phenylthiohydantoin (PTH)-Derivates von 3-Hydroxyprolin. Säule : Beckman Ultra-Spheres C18, Reversed Phase. Durchfluß 1.5 ml pro min, ansonsten unter Bedingungen wie von Lottspeich (1980) beschrieben. Sterne bezeichnen die Signale des 3-Hydroxyprolin-PTH, A=Auftrag, S=Pos. des Serin-PTH, P=Pos. des Prolin-PTH, $\bar{P}$ =Pos. des 4-Hydroxyprolin-PTH, n-Leu=Nor-Leucin wurde als interner Standard mitgeführt.

- 35 -

[illegible]

2.3. Charakterisierung von Fragment P1 aus der bovinen Linsenkapsel

Ein dem Tumorfragment P1 analoges Fragment aus der bovinen Linsenkapsel wurde ebenfalls näher untersucht. Dies sollte Hinweise geben, inwieweit sich $\alpha 1$ (IV) Ketten verschiedener Organe und Spezies in ihrer kovalenten Struktur unterscheiden. Das Ausgangsmaterial, ein Gemisch der Fragmente P1 und P2, wurde von Dr.S.N. Dixit, University of Memphis/Tennessee zur Verfügung gestellt (Dixit und Kang, 1979). Fragment P1 wurde analog zu dem Tumormaterial an CM-Zellulose gereinigt.

2.3.1. Spaltung des Fragmentes P1 mit Bromcyan

Das Linsenkapselfragment P1 (50-100 mg) wurde reduziert und mit BrCN gespalten. Die Chromatographie über Sephadex G75 führte zu einem reproduzierbaren Fragmentprofil (Abb.18). Einzelne Fraktionen konnten mittels Phosphozellulose aufgetrennt werden. Die Separierung der Peptide CB3 (70 Reste) und CB10b (71 Reste) erwies sich als schwierig. Chromatographie über Phosphozellulose ergab zwar ein komplexes Profil, aber keine in der Sequenzanalyse homogenen Peptide. HPLC jedoch ermöglichte eine Trennung in zwei distinkte Fraktionen (Abb.19). Insgesamt wurden acht BrCN-Peptide mit 5-157 Aminosäuren erhalten. Sie alle zeigen eine charakteristische Zusammensetzung (Tab.6) und ei-

ne deutliche Ähnlichkeit zu den analogen BrCN-Peptiden aus dem Maustumor. Aus diesem Grunde wurde die entsprechende Nomenklatur übernommen. Alle Peptide, mit Ausnahme von CB10a (5 Reste), wurden der N-terminalen Sequenzanalyse unterworfen und ließen sich so in das Schema der Abb.20 einordnen.

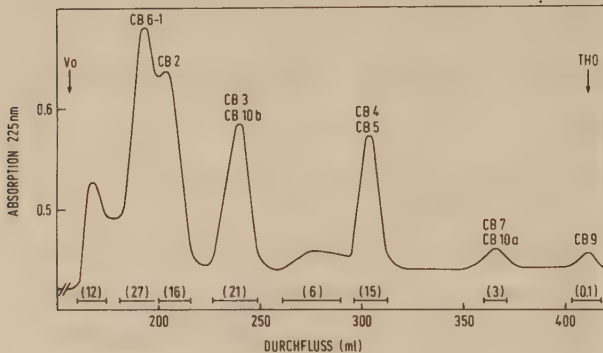


Abb.18 : Chromatographie der BrCN-Peptide von Fragment P1 aus der Linsen kapsel über Sephadex G75. Die Bedingungen sind dieselben wie in Abb.6 angegeben. V_0 =Ausschlußvolumen, THO=Totalvolumen der Säule. Angabe der relativen Ausbeuten in Prozent der Gesamtausbeute in Klammern.

Gegenüber dem Fragment P1 aus dem Maustumor ergaben sich drei wesentliche Unterschiede, von denen zwei auf einer Veränderung im Methioningehalt beruhen. In Peptid CB6-1 (157

Reste) ist das Methionin der Position 16 gegen ein Valin ausgetauscht. Sequenzanalyse dieses Peptides lieferte einen weiteren Beweis der Aufeinanderfolge von CB6 (16 Reste) und CB1 (141 Reste) in Fragment P1 des Tumors (s. Sequenzdaten in Abb.17 und 22). Der Ersatz eines Serin durch ein Methionin in Position 5 der Tumorpeptidsequenz von CB10 (76 Reste) führt zu zwei BrCN-Peptiden, CB10a (5 Reste) und CB10b (71 Reste) in der Linsenkapsel.

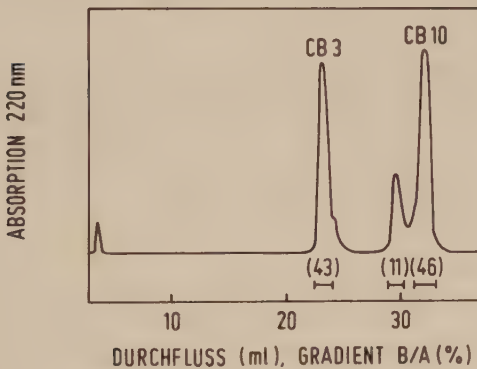


Abb.19 : Trennung der Peptide CB3 und CB10b durch HPLC.

Unter Bedingungen wie in Abb.15 angegeben.

Anstieg Phase B/A 1% pro min. Relative Ausbeuten bezogen auf 100% Gesamtausbeute in Klammern.

In den verschiedenen Präparaten des Linsenkapselfragmentes fehlte das N-terminale Tetrapeptid CB8, in einigen auch

Tab. 6 : Aminosäurezusammensetzung von Fragment Pl (Linsenkapsel) und seinen Bromcyanpeptiden

	CB6-1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB7	CB10a	CB10b	Summe	Pl
3-Hydroxyprolin	1	-	-	-	0.5	-	-	-	1.5	1.5
4-Hydroxyprolin	21	15	7	7	6	2	1	9	68	67
Asparaginsäure	6	6	6	2	1	1	-	3	25	24
Threonin	4	1	3	1	1	1	-	1	12	11
Serin	6	10	4	-	1	2	-	3	26	28
Glutaminsäure	14	10	7	5	7	-	-	7	50	48
Prolin	14	5	4	3	4.5	1	-	2	33.5	32.5
Glycin	52	39	23	13	13	3	2	23	168	167
Alanin	5	3	3	1	1	-	-	5	18	18
Valin	5	3	2	-	1	1	-	1	13	14
Methionin	1	1	1	1	1	-	1	1	7	5
Isoleucin	3	3	1	-	-	-	-	5	12	14
Leucin	8	6	1	4	2	-	1	3	25	25
Tyrosin	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1
Phenylalanin	6	5	-	1	-	1	-	1	14	14
Histidin	1	-	1	-	1	1	-	-	4	6
Hydroxylysin	9	9	5	2	1	-	-	6	32	33
Lysin	-	1.5	1	-	-	-	-	-	3.5	4
Arginin	1	1	1	1	2	-	-	1	7	8
Insgesamt	157	120	70	41	43	13	5	71	520	521

Angabe der Zusammensetzung in Resten pro Peptid. Methionin als Homoserin bestimmt(ausgen. Pl).

das darauffolgende Tripeptid CB9 . In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen beginnt der N-Terminus des Fragmentes entweder mit der Sequenz von CB9 oder direkt mit der von CB3 . Wahrscheinlich verursacht hier die unterschiedliche Behandlung des Gewebes mit Pepsin die gering differierenden

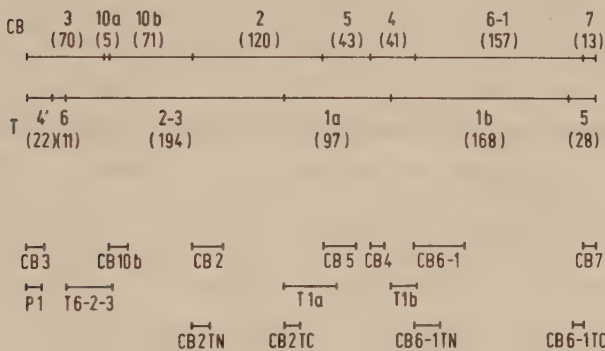


Abb.20 : Reihenfolge der BrCN-(CB) und der tryptischen(T) Peptide in Fragment P1 aus der Linsenkapsel. Einige zusätzliche, durch Nachspaltungen erhaltene und sequenzierte Schlüsselpeptide sind mit ihren relativen Positionen in P1 gleichfalls aufgeführt. Die jeweilige Anzahl der Aminosäurereste ist für jedes Peptid in Klammern angegeben. Insgesamt wurden ca. 45% der Sequenzpositionen des Fragmentes bestimmt (vgl. auch das Schema in Abb.10 für das Fragment P1 aus dem Tumor).

Spaltstellen. Möglicherweise könnte aber auch ein Aminosäureaustausch der Grund für die veränderte Spezifität der Pepsinspaltung sein. Der C-Terminus dagegen in Form von Peptid CB7 (13 Reste) gleicht dem des Tumorfragmentes P1. Peptid CB7 wurde auch in der Bromcyanspaltung der C' (MG ca. 130.000) und der C (MG ca. 100.000) Kette gefunden (Dixit und Kang, 1979). Dies ermöglichte, Fragment P1 dem C-Terminus der $\alpha 1(IV)$ Kette zuzuordnen (Abb.4).

2.3.2. Nachspaltung von Bromcyanpeptiden aus Fragment P1 (Linsenkapsel) mit Trypsin

Da die Bromcyanpeptide mit Ausnahme von CB7 und CB10a Arginin und zum Teil Lysin enthalten, wurden sie mit Trypsin 4h lang bei 37° inkubiert. CB10b (71 Reste) erweist sich wie CB10 (76 Reste) im Tumor als nicht spaltbar. Unterschiede zu Fragment P1 aus dem Tumor ergeben sich aus dem Vorliegen von zwei unter den angewandten Bedingungen allerdings nur gering spaltbaren Argininresten in Peptid CB5 (43 Reste) und einem spaltbaren Argininrest in Position 15 von CB4 (41 Reste). Ferner enthält Peptid CB2 (120 Reste) kein Arginin in Position 7 wie das analoge Peptid des Tumors. Einige Schlüsselfragmente wurden partiell sequenziert (s.Übersicht in Abb.20) und ließen deutliche Homologien zu den entsprechenden Fragmenten des Maus kollagens erkennen (Abb.22).

2.3.3. Tryptische Spaltung von Fragment P1 (Linsenkapsel)

Fragment P1 wurde für 4h bei 30° mit Trypsin gespalten und an Sephadex G75 chromatographiert (Abb.21). Bereits der Austausch von zwei spaltbaren Argininresten verschob hier wesentlich das Fragmentierungsmuster gegenüber dem P1 der Maus. Peptide T1a (97 Reste) und T1b (168 Reste) aus der Linsenkapsel entstehen aus dem T1 (265 Reste) der Maus wegen eines Argininrestes anstelle eines Hydroxyprolinrestes in Position 15 von Peptid CB4 . Peptid T2 (120 Reste) der Maus dagegen wird auf Grund des fehlenden Argininrestes in Position 7 von Peptid CB2 der Linsenkapsel um Peptid T3 (74 Reste) zu T2-3 (194 Reste) verlängert.

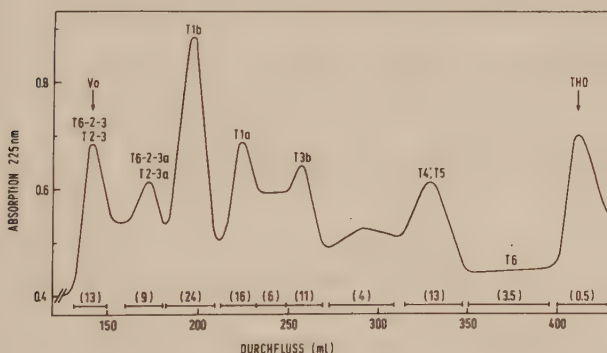


Abb.21 : Chromatographie der tryptischen Peptide von Fragment P1 aus der Linsenkapsel über Sephadex G75. Bedingungen wie in Abb.6 angegeben. V₀=Ausschlußvolumen, THO=Totalvolumen der Säule. Angabe der relativen Ausbeuten in Klammern.

Die Fraktionen der tryptischen Peptide aus der Chromatographie an Sephadex G75 wurden über Phosphozellulose, Sephadex G50, Biogel P4 und HPLC gereinigt. Hauptsächlich konnten die Peptide T1a (97 Reste), T1b (168 Reste), T2-3 (194 Reste), T4' (22 Reste), T5 (28 Reste) und T6 (11 Reste) erhalten werden. Ihre Benennung erfolgte in Anlehnung an die Nomenklatur für die Peptide aus dem Maustumor. Die Aminosäureanalysen der T-Peptide stehen in ihrer Summe in guter Übereinstimmung mit der Aminosäureanalyse von Fragment P1 (Tab.7).

Peptid T2-3 (194 Reste) wurde reduziert und mit BrCN nachgespalten. Durch Chromatographie über Sephadex und Phosphozellulose konnten die Peptide CB3TC (37 Reste), CB10a (5 Reste), CB10b (71 Reste) und T3 (74 Reste) erhalten werden. Dies erlaubte die Einordnung des Pentapeptids CB10a zwischen CB3 und CB10b .

Tabelle 4 gibt einen Überblick der tryptischen(T) und der in ihnen enthaltenen CBT-Peptide.

2.3.4. Sequenzanalyse der Peptide aus dem P1 der Linsenkap- sel und Vergleich mit Peptiden aus dem P1 der Maus

Die N-terminalen Sequenzen der Bromcyan-Peptide (ohne das Pentapeptid CB10a), der tryptischen Peptide (ohne T4') sowie einiger durch Nachspaltung erhaltener (CBT) Frag-

Tab. 7 : Aminosäurezusammensetzung von Fragment P1 (Linsenkapsel) und seinen tryptischen Peptiden

	T1a	T1b	T2-3	T4	T5	T6	Summe	P1
3-Hydroxyprolin	0.5	-	-	-	1	-	1.5	1.5
4-Hydroxyprolin	13	24	27	-	4	3	71	67
Asparaginsäure	3	7	8	2	2	1	23	24
Threonin	1	4	3	2	1	1	12	11
Serin	5	7	12	2	3	-	29	28
Glutaminsäure	11	16	15	4	-	-	46	48
Prolin	5.5	13	10	1	3	-	32.5	32.5
Glycin	31	56	62	7	8	4	168	167
Alanin	2	6	9	-	-	-	17	18
Valin	2	4	4	-	1	1	12	14
Methionin	2	1	3	-	1	-	7	5
Isoleucin	1	4	8	-	-	-	13	14
Leucin	6	8	10	-	1	-	25	25
Tyrosin	-	-	1	-	-	-	1	1
Phenylalanin	4	6	2	-	2	-	14	14
Histidin	1	1	1	-	1	-	4	6
Hydroxylysin	6	10	15	3	-	-	34	33
Lysin	-	-	2	-	-	1	3	4
Arginin	3	1	2	1	-	-	7	8
Insgesamt	97	168	194	22	28	11	520	521

Angabe der Zusammensetzung in Resten pro Peptid.

Tab.8 : Vergleich der Aminosäureanalysen der tryptischen Peptide von P1 aus Linsenkapsel mit den
aus den jeweiligen Bromcyanpeptiden erhaltenen tryptischen Spaltprodukten

	CB3 TC	CB10a	CB10b	CB2 TN	T3b	Summe = T2-3	CB2 TC	CB5	CB4 TN	Summe = T1a
3-Hydroxyprolin	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	0.5
4-Hydroxyprolin	5	1	9	4	6	27	4	7	2	13
Asparaginsäure	2	-	3	1	2	8	2	1	-	3
Threonin	-	-	1	-	1	2	-	1	-	1
Serin	3	-	3	4	3	13	4	1	-	5
Glutaminsäure	3	-	7	2	5	17	2	6	3	12
Prolin	2	-	2	2	3	9	-	4.5	1	5.5
Glycin	12	2	23	8	18	63	13	13	5	31
Alanin	2	-	5	-	2	9	1	1	-	2
Valin	2	-	1	1	1	5	1	1	-	2
Methionin	1	1	1	-	-	3	1	1	-	2
Isoleucin	1	-	5	-	2	8	1	-	-	1
Leucin	1	1	3	1	4	10	1	2	3	6
Tyrosin	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
Phenylalanin	-	-	1	1	-	2	4	-	-	4
Histidin	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1
Hydroxylysin	2	-	6	2	4	14	4	1	-	5
Lysin	-	-	-	1	0.5	1.5	2	-	-	-
Arginin	-	-	1	-	1	2	-	2	1	3
Insgesamt	37	5	71	28	53	194	39	43	15	97

Angabe der Zusammensetzung in Resten pro Peptid. Methionin in den BrCN-Peptiden als Homoserin bestimmt.
* mit Ausnahme der nicht mit Trypsin spaltbaren BrCN-Peptide

Tab. 8 : Fortsetzung

	CB4 TC	CB6-1 TN	Summe =	TLb	CB1 TC	CB7	Summe =	TS
3-Hydroxyprolin	-	-	-	-	1	-	1	1
4-Hydroxyprolin	5	17	22	24	3	2	5	4
Asparaginsäure	2	5	7	7	1	1	2	2
Threonin	1	4	5	4	-	1	1	1
Serin	-	5	5	7	1	2	3	3
Glutaminsäure	2	14	16	16	-	-	-	-
Prolin	2	13	15	13	1	1	2	3
Glycin	8	47	55	56	5	3	8	8
Alanin	1	5	6	6	-	-	-	-
Valin	-	5	5	4	-	1	1	1
Methionin	1	-	1	1	1	-	1	1
Isoleucin	-	4	4	4	-	-	-	-
Leucin	1	7	8	8	1	-	1	1
Phenylalanin	1	5	6	6	1	1	2	2
Histidin	-	1	1	1	-	1	1	1
Hydroxylysin	2	9	11	10	-	-	-	-
Arginin	-	1	1	1	-	-	-	-
Insgesamt	26	142	168	168	15	13	28	28

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin in den BrCN-Peptiden als Homoserin bestimmt. Die Peptide sind in ihrer Reihenfolge vom Amino- zum Carboxyende aufgelistet. Die Zusammensetzung des jeweiligen tryptischen Peptids sollte im Idealfall genau der Summe der in ihm enthaltenen (und davor aufgelisteten) Fragmente entsprechen.

mente sind in Abb.22 zusammengefaßt. Zusätzlich sind die Sequenzen der Peptide CB3, CB5 und CB10 aus dem P1 der Maus zum direkten Vergleich aufgeführt. Insgesamt wurden etwa 45% der Positionen im P1 der Linsen kapsel bestimmt (70% im P1 der Maus, Abb.17). Der Sequenzvergleich beider P1-Fragmente zeigt Abschnitte großer Homologie (z.B. CB5) im Wechsel mit Bereichen, die eine hohe Anzahl an Aminosäureaustauschen aufweisen (z.B. in CB4). Der einzige Tyrosinrest von Fragment P1 wurde für die Linsen kapsel in Position 15 von Peptid CB2 (120 Reste) anstelle eines Histidin für das analoge Mauspeptid gefunden, während der Tyrosinrest für den Maustumor in CB1 (141 Reste) lokalisiert ist. Peptid T1b (168 Reste) enthält in Position 5 (Position 20 in Peptid CB4) einen Tryptophanrest. Diese Aminosäure wurde bisher in keiner der bekannten kollagenen α -Ketten gefunden.

Ein weitergehender Vergleich der Sequenzdaten beider Fragmente P1 erfolgt im Diskussionsteil dieser Arbeit.

Abb.22 : Fortsetzung

CB4*		¹⁰ Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Glu-Gly-Leu-Glu-Gly-Arg-Gly-Asn-Hyp-Gly-Trp- ²⁰ XXX-Gly-Thr-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly-Asp-Pro-Gly-Phe
Linse CB5		¹⁰ Gly-Hyp-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Gln-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Thr-Hyp-Gly-His-Gln-Asp- ³⁰ Gly-Hyp-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Gln-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Thr-Hyp-Gly-His-Pro-Val-Glu- ²⁰ Gly-Pro-XXX-Gly-Ala-XXX-Gly Maus CB5 Gly-Pro-Pro-Gly-Asp-Gln-Gly
CB7		¹⁰ Gly-Pro-Hyp-Gly-Thr-Hyp-Ser-Val-Asp-His
Linse CB10b		¹⁰ Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly-Val-Ala-Gly-Ile-Hyp-Gly-Ser-Gln-Gly-Ile- Maus CB10 Gly-Leu-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Glu-XXX-Gly-Val-Pro-Gly-Ile-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile- ²⁰ Linse CB10b Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Glu-XXX-Gly Maus CB10 Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Asp-XXX-Gly
T1a		¹⁰ Gly-Phe-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ser-XXX-Gly-Asp-XXX-Gly-Ser-XXX-Gly-Asp-Val-Gly-Phe- ³⁰ XXX-Gly-Leu-Asp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Ile-Hyp-Gly-Ser-XXX-Gly-Glu-Gln-Gly-Phe-Met-Gly- ⁴⁰ Pro-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly-Gln-Hyp-Gly

*Die Sequenz von Peptid CB4 ab Pos.30 stammt von Dixit et al. (pers. Mitteilung)
und darf noch nicht als gesichert betrachtet werden

Abb.22 : Fortsetzung

T1b	Gly-AsN-Hyp-Gly-Trp-Hyp-Gly-XXX-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Pro-Gly-XXX-Pro-Gly-Phe ²⁰
	¹⁰
T2-3	Asp-Gly-GIN-Ala-Gly-His-Hyp-Gly-GIN-Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly-Asp
	¹⁰
T6	Gly-Asp-Hyp-Gly-Thr-Hyp-Gly-Val-Hyp-Gly-Lys
	¹⁰

zu Abb.22 : Zeichenerklärung s. Abb.17 .

Die Sequenzen von Fragment P1 aus Linsenkapsel wurden in einigen Fällen direkt mit denen von Fragment P1 aus Maustumor verglichen. In den anderen Fällen, ohne Vergleich, sind die variablen Positionen mit (---) unterstrichen. Nichttripeptidhelikale Segmente wurden mit (—) markiert. Die Peptid T1b homologe Sequenz aus dem Tumor lag noch nicht vor.

2.4. Charakterisierung des Fragmentes P2 aus der $\alpha 2(IV)$

Kette der Maus

Fragment P2 (MG ca. 50.000 in der Disk-Elektrophorese) wurde reduziert, mit BrCN gespalten und an Sephadex G75 chromatographiert (Abb.23). Aus den über Phosphozellulose, Sephadex G50, Biogel P2 und HPLC nachgereinigten Fraktionen konnten elf Bromcyan-Peptide erhalten werden. Ein weiteres Peptid, CB10a (4 Reste) wurde als eine um drei Aminosäuren verkürzte Variante des C-terminalen Peptides CB10 (7 Reste) isoliert. Die Peptide wurden in ihren Zusammensetzungen (Tab.9) sowie partiell in ihren

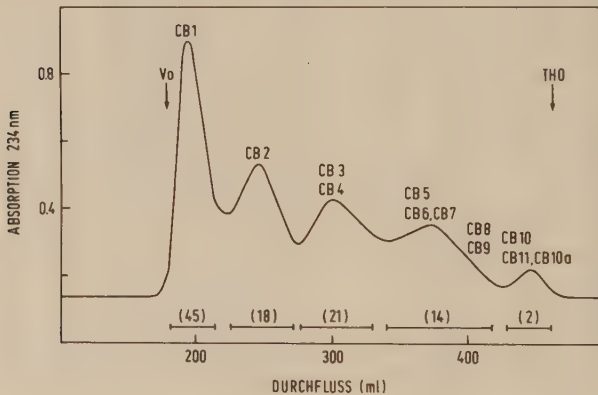


Abb.23 : Chromatographie der Bromcyan-Peptide von Fragment P2 an Sephadex G75 . Unter den in Abb.6 angegebenen Bedingungen. V_0 =Ausschlußvolumen, TH_0 =Totalvolumen der Säule. Angabe der prozentualen Ausbeuten der einzelnen Fraktionen in Klammern.

N-terminalen Sequenzen charakterisiert (Abb.24). Die Summe der Zusammensetzungen der BrCN-Peptide entspricht weitgehend der Zusammensetzung von Fragment P2 .

Wegen des fehlenden Homoserin bildet Peptid CB10 (7 Reste) den C-terminalen Abschluß des Pepsinfragmentes. Es besitzt die Sequenz (Gly, Ser, Hyp,)-Arg-Val-Gly-Ser, die durch Abbau mit Carboxypeptidase Y von Peptid CB10 und Fragment P2 bestimmt wurde. Die verkürzte Variante des C-terminalen BrCN-Peptides, CB10a, entsteht offenbar durch eine weitere Spaltung der Arg-Val Bindung mittels Pepsin.

Edman-Abbau ermöglichte die Bestimmung von ca. 35% der Sequenzpositionen in Fragment P2 (Abb.24). 30 der N-terminalen Positionen von P2 konnten sequenziert werden. Dies erlaubte bereits die Festlegung der Aufeinanderfolge von CB11 (3 Reste)-CB9 (13 Reste)-CB8 (14 Reste) am N-Terminus.

Nichttripelhelikale Segmente konnten am N-Terminus von Fragment P2 (7 Reste), am C-Terminus (mindestens 4 Reste) sowie in den Peptiden CB2 (Insertion eines Restes in Pos. 20) und CB3 (Insertion von 6 Resten in Pos. 10-15) aus dem zentralen Bereich von P2 identifiziert werden.

Für weitere strukturelle Untersuchungen wurde Peptid CB3 (68 Reste) mit Trypsin abgebaut und das Abbaugemisch über Phosphozellulose und Biogel P4 in die Peptide CB3T1 bis CB3T6 aufgetrennt. Die Aminosäureanalysen der Fragmente

sind in Tab.9a aufgeführt. Die Zusammensetzung der Peptide CB3T2 und CB3T4 entspricht dem Beginn des sequenzierten Bereiches von Peptid CB3 und bestätigt die große Insertion nichttripelhelikaler Aminosäuren in den Positionen 10 bis 15 .

Generell deuten alle Sequenzdaten nur auf eine geringe Ähnlichkeit mit den Peptiden hin, die aus Fragment P1 erhalten werden konnten (s.Diskussion).

Tab. 9 : Aminosäurezusammensetzung von Fragment P2 und seinen Bromcyanpeptiden

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10a (CB10)	CB11	Summe	P2
3-Hydroxyprolin	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1.5
4-Hydroxyprolin	24	10	6.5	6	3	1.5	3	-	-	1(1)	-	55	54.5
Asparaginsäure	11	4	1	2	1	3	1	-	2	-	-	25	26
Threonin	6	6	1	1	-	1	-	-	-	-	-	15	15
Serin	10	5	5	2	2	2	2	-	-	1(2)	-	29	27
Glutaminsäure	17	5	7	5	5	2	4	1	2	-	-	48	44
Prolin	12	3	5.5	3	3	3.5	2	-	1	-	1	34	36
Glycin	63	27	19	15	10	10	8	5	3	1(2)	1	162	164
Alanin	8	3	4	1	1	2	1	-	-	-	-	20	21
Valin	7	4	3	2	1	1	-	-	-	(1)	-	18	20
Methionin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	10	9
Isoleucin	8	4	4	2	-	-	-	1	1	-	-	20	19
Leucin	11	4	3	3	2	-	1	3	-	-	-	27	24
Tyrosin	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	1
Phenylalanin	7	6	2	2	1	1	-	-	-	-	-	19	21
Histidin	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	4
Hydroxylysin	7	4	-	2	2	2	-	2	2	-	-	21	20
Lysin	-	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-	4	5
Arginin	6	2	4	1	-	1	1	-	-	1(1)	-	16	17
Insgesamt	201	88	68	48	32	32	25	14	13	4(7)	3	525	528

Tab.9

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin mit Ausnahme von P2 als Homoserin bestimmt.

Tab. 9a : Aminosäurezusammensetzung von P2CB3 und seinen tryptischen Peptiden

	CB3 T1	T2	T3	T4	T5	T6	Summe	CB3
4-Hydroxyprolin	3	-	1.5	1	1	-	6.5	6.5
Asparaginsäure	1	-	-	-	-	-	1	1
Threonin	-	1	-	-	-	-	1	1
Serin	1	1	1	1	-	1	5	5
Homoserin	-	-	-	-	-	1	1	1
Glutaminsäure	2	2	1	1	-	1	7	6
Prolin	2	2	0.5	1	-	-	5.5	6.5
Glycin	6	3	4	3	2	1	19	20
Alanin	1	1	1	-	1	-	4	4
Valin	-	1	2	-	-	-	3	3
Isoleucin	1	1	-	2	-	-	4	3
Leucin	2	1	-	-	-	-	3	3
Phenylalanin	1	-	1	-	-	-	2	2
Lysin	-	-	-	1	1	-	2	2
Arginin	2	1	1	-	-	-	4	4
Insgesamt	22	14	13	10	5	4	68	68

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid.

Abb. 24 : Sequenzdaten von Fragment P2 aus dem Maustumor
und einigen seiner Bromcyanpeptide

P2	Pro-Gly-Met-Lys-Asp-Ile-XXX-Gly-Glu-XXX-Gly-Asp-Glu-Gly-Pro-Met-Gly-Leu-XXX-Gly-Tyr-Ile-Gly-Leu-XXX-Gly-Leu-Gln-Gly-Met	10 30	20
CB1	Ala-Gly-Ala-Gln-Gly-Ser-Hyp-Gly-Leu-XXX-Gly-Gln-Thr-Gly-Phe-Hyp-Gly-Leu-Thr-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Gln-Gly-Glu-Hyp-Gly-Gly-Leu-Gly-Ile	10 30	20
CB2	Hyp-Gly-Val-Hyp-Gly-Val-Ser-Gly-Phe-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-XXX-Hyp-Gly-Phe-Ile-XXX-Gly-Val-XXX-Gly-Asp-Ile-Gly-Val-Hyp-Gly-Thr-Hyp-Gly-XXX-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Val-Ser-Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-His-Gly-Phe-Hyp	10 30 50	20 40
CB3	Gly-Ser-Hyp-Gly-Ile-Hyp-Gly-Ile-Gln-Lys-Ile-Ala-Val-Gln-Pro-Gly-Thr-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Ser-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Ala-Leu-Gly-Gln-Ile-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Hyp	10 30	20
CB4	Gly-Leu-Hyp-Gly-XXX-Hyp-Gly-Gln-Pro-Gly-Val-Pro-Gly-Ile-Hyp	10	
CB6	Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly-Gly-Val-Gly	10	
CB8	Gly-Leu-XXX-Gly-Tyr-Ile-Gly		
CB9	Lys-Asp-Ile-XXX-Gly-Glu-XXX-Gly-Asp-Glu-Gly-Pro-(Met)	10	

zu Abb.25 : s.auch Abb.17 . Nichttripeptidale Segmente sind unterstrichen.

2.5. Charakterisierung von Fragmenten aus der $\alpha 3(IV)$ Kette des Tumorkollagens

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß der Maustumor eine Kollagenkette enthält (MG ca. 100.000), die über Disulfidbrücken quervernetzt ist (Timpl et al., 1979).

Diese Kette (im weiteren als $\alpha 3$ bezeichnet) wies eine Aminosäurezusammensetzung auf, die charakteristisch für Typ IV Kollagen ist, und enthielt besonders viel Hydroxyprolin (ca. 15 Mol%). Die Trennung des $\alpha 3$ -Fragmentes von weiteren disulfidvernetzten Fragmenten (z.B. 7S Kollagen) erwies sich als äußerst schwierig und erlaubte nur begrenzte Untersuchungen mit dem Material. Längerer Pepsinabbau der Tumormatrix bei pH 2-2.5 produzierte jedoch substantielle Mengen von ebenfalls hydroxyprolinreichen Fragmenten P4 und P4' mit Molekulargewichten von ca. 40.000 bzw. 48.000 . Zusätzliche Untersuchungen der Fragmentierungsmuster zeigten, daß P4 und P4' durch einen weiteren Abbau von $\alpha 3$ entstanden sind. Eine mögliche Anordnung der Fragmente veranschaulicht Abb.25 .

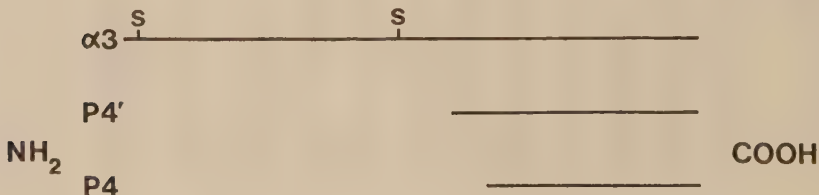


Abb.25 : Postulierte Anordnung der Fragmente $\alpha 3$, P4' und P4 innerhalb der $\alpha 3(IV)$ Kette. "S" bezeichnet die vorläufige Lokalisierung von Disulfidbrücken in $\alpha 3$.

2.5.1. Bromcyanpeptide des Fragmentes $\alpha 3$

Fragment $\alpha 3$ wurde nach Reduktion und Alkylierung durch zweifache Rechromatographie über Agarose A5m angereichert und repräsentierte mindestens zwei Prozent der hochmolekularen Typ IV Kollagenfragmente.

Etwa 20 mg des Materials wurden mit Bromcyan gespalten und an Sephadex G75 aufgetrennt (Abb.26). Das komplexe Profil wurde durch eine Kombination von Molekularsieb- und Ionenaustauscherchromatographie sowie HPLC in 14 distinkte Bromcyanpeptide CB1 bis CB14 aufgetrennt. Jedes der Peptide zeigt eine charakteristische Aminosäurezusammensetzung (Tab.10). Ihre Größe variiert zwischen 7 (CB14) und 266 (CB1) Aminosäuren. Die Summe der Aminosäurezusammensetzungen zeigt mit wenigen Ausnahmen (Lysin, Leucin) eine gute Übereinstimmung mit der Ausgangsanalyse. Es konnte kein Peptid ohne Homoserin identifiziert werden. Es ist möglich, daß ein kleines C-terminales Peptid bei der Reinigung verloren ging, oder daß $\alpha 3$ Methionin am Carboxylende besitzt. Die fünf Cysteinreste wurden in den Peptiden CB2 (221 Reste), CB3 (158 Reste), CB4 (94 Reste) und CB9 (37 Reste) gefunden. Eine Lokalisation dieser Reste näher am N-Terminus des Fragmentes $\alpha 3$ ist wahrscheinlich, wenn man eine Homologie zu der $\alpha 1(IV)$ oder $\alpha 2(IV)$ Kette zu Grunde legt.

Wegen der geringen Materialmengen konnten nur die Peptide CB1 (266 Reste) und CB2 (221 Reste) in der Sequenzierung

eingesetzt werden (s. Abb. 28). Peptid CB1 zeigte eine charakteristische tripelhelikale Sequenz mit zwei sonst relativ selten vorkommenden Argininresten in Position 3 und 9. Die andere Sequenz (Peptid CB2) startete mit einem nicht-tripelhelikalen Segment, das überraschenderweise zwei 4-Hydroxyprolinreste enthielt. Da die Sequenzanalyse nicht wiederholt werden konnte, muß das Ergebnis als vorläufig

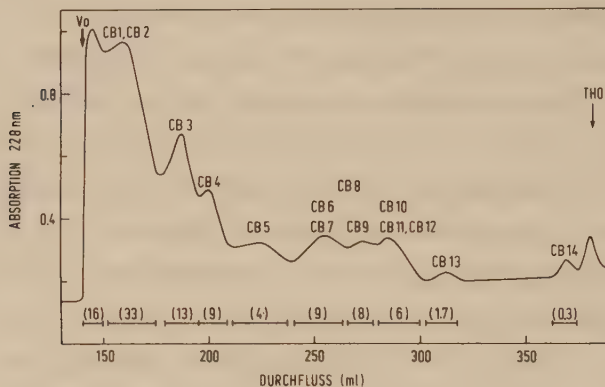


Abb. 26 : Chromatogramm der Bromcyanpeptide von Fragment $\alpha 3$ über Sephadex G75. Bedingungen wie in Abb. 6 angegeben. V_0 = Ausschlußvolumen, THO = Totalvolumen der Säule. Relative prozentuale Ausbeuten in Klammern. Die vorderste Schulter mit 16% der Gesamtausbeute zeigte in der Disk-Elektrophorese fünf Banden mit Molekulargewichten zwischen 40.000 und 80.000. Diese Peptide stellen vermutlich ungespaltene Fragmente dar und wurden nicht weiter untersucht.

betrachtet werden. Zwei Versuche, das gesamte Fragment $\alpha 3$ zu sequenzieren, ergaben nur geringe Ausbeuten und weisen auf eine Blockierung des N-Terminus hin.

2.5.2. Bromcyanpeptide des Fragmentes P4'

Fragment P4' konnte nur bei einem präparativen Ansatz in substantiellen Mengen erhalten werden. Es enthielt im Gegensatz zu $\alpha 3$ kein Cystein. Bromcyanspaltung zeigte wie erwartet ein weniger komplexes Peptidprofil an Sephadex G75 (Abb.27). Sieben BrCN-Peptide (6 bis 266 Reste) konnten aus Fragment P4' durch Nachreinigung mittels Phosphozellulose, Biogel P2 und HPLC erhalten werden. Die Summe

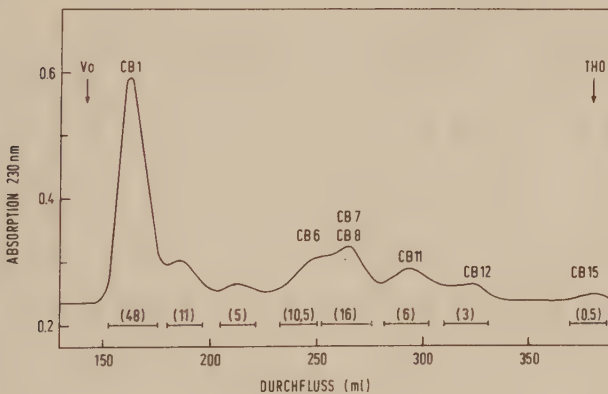


Abb.27 : Chromatographie der Bromcyanpeptide von Fragment P4' über Sephadex G75 . Bedingungen wie für Abb.6 angegeben. V_o =Ausschlußvolumen, THO=Totalvolumen. Relative Ausbeuten in Klammern.

Tab.10 : Aminosäurezusammensetzung der Fragmente $\alpha 3$ und P4 und ihrer Bromcyanpeptide

	CB1*	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7*	CB8*	CB9	CB10	CB11*
3-Hydroxyprolin	1.5	1	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxyprolin	40	29	17	16	8	9	7	6.5	5	4	4
Asparaginsäure	9	11	7	6	3	3	4	-	2	1	1
Threonin	5	6	4	3	2	2	2	1	-	1	-
Serin	11	11	13	4	4	3	3	2	3	-	2
Glutaminsäure	21	27	20	9	6	5	3	5	2	3	2
Prolin	18.5	16	9	8	4.5	4	2	2.5	3	1	2
Glycin	91	69	48	32	21	15	17	14	12	9	8
Alanin	8	7	6	3	2	2	1	-	1	-	-
Valin	9	3	5	2	2	1	1	1	1	1	-
Methionin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Isoleucin	10	5	3	2	1	1	-	-	1	2	1
Leucin	14	11	4	5	3	4	3	3	1	4	1
Tyrosin	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Phenylalanin	7	6	4	2	2	1	1	1	2	1	1
Histidin	1	2	1	1	-	1	-	-	-	-	1
Hydroxylysin	8	5	7	4	4	2	3	1	2	2	-
Lysin	2	2	3	1	-	1	-	-	-	-	1
Cystein	-	2	1	1	-	-	-	-	1	-	-
Arginin	9	6	4	3	1	2	1	-	-	1	-
Insgesamt	266	221	158	94	65	57	50	38	37	31	24

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin als Homoserin, Cystein als Aminoäthylcystein bestimmt. Mit * bezeichnete Peptide kommen auch in Fragment P4 vor.

Tab.10 : Fortsetzung

Fragment P4 :

	CB12	CB13*	CB14	Summe	α 3	CB15**	CB16 §	Summe P4CB	P4
3-Hydroxyprolin	0.5	-	-	3.5	4	-	-	1.5	1
4-Hydroxyprolin	3.5	3	-	152	157	0.5	-	61	62
Asparaginsäure	1	2	1	51	48	1	1	17	17
Threonin	-	-	-	26	23	-	-	8	8
Serin	1	1	1	59	56	1	-	20	20
Glutaminsäure	2	2	1	108	108	1	-	34	32
Prolin	2	-	1	73.5	76	0.5	-	26	28
Glycin	7	5	2	360	352	2	-	137	134
Alanin	-	-	-	30	29	-	-	9	10
Valin	-	-	-	26	30	-	-	11	12
Methionin	1	1	1	14	12	-	1	6	7
Isoleucin	-	-	-	26	23	-	-	11	11
Leucin	1	1	-	55	47	-	-	22	21
Tyrosin	-	-	-	3	3	-	-	-	-
Phenylalanin	-	1	-	29	26	-	1	12	11
Histidin	-	-	-	7	9	-	-	2	2
Hydroxylysin	1	1	-	40	43	-	-	13	15
Lysin	-	-	-	10	5	-	-	3	2
Cystein	-	-	-	5	5	-	-	-	-
Arginin	-	-	-	27	25	-	-	10	10
Insgesamt	20	17	7	1085	1081	6	3	404	403

Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin mit Ausnahme der Fragmente als Homoserin bestimmt, Cystein als Aminoäthylcystein. **CB15 kommt in Fragment P4 und P4', §CB16 nur in Fragment P4 vor.

Tab.11 : Aminosäurezusammensetzung von Fragment P4' und seinen Bromcyanpeptiden

	CB1	CB6	CB7	CB8	CB11	CB13	CB15	Summe	P4'
3-Hydroxyprolin	1.5	-	-	-	-	-	-	1.5	1
4-Hydroxyprolin	40	9	7	6.5	4	3	0.5	70	70
Asparaginsäure	9	3	4	-	1	2	1	20	19
Threonin	5	2	2	1	-	-	-	10	11
Serin	11	3	3	2	2	1	1	23	22
Glutaminsäure	21	5	3	5	2	2	1	39	39
Prolin	18.5	4	2	2.5	2	-	0.5	30	28
Glycin	91	15	17	14	8	5	2	152	150
Alanin	8	2	1	-	-	-	-	11	12
Valin	9	1	1	1	-	-	-	12	14
Methionin	1	1	1	1	1	1	-	6	7
Isoleucin	10	1	-	-	1	-	-	12	13
Leucin	14	4	3	3	1	1	-	26	25
Tyrosin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenylalanin	7	1	1	1	1	1	-	12	13
Histidin	1	1	1	-	-	-	-	3	2
Hydroxylysin	8	2	3	1	-	1	-	15	18
Lysin	2	1	-	-	1	-	-	4	3
Arginin	9	2	1	-	-	-	-	12	13
Insgesamt	266	57	50	38	24	17	6	459	460

Angabe der Zusammensetzungen in Resten pro Peptid. Methionin mit Ausnahme von Fragment P4' als Homoserin bestimmt. Peptid CB15 findet sich nur in den Fragmenten P4' und P4, nicht in $\alpha 3$.

der Zusammensetzungen zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Ausgangsanalyse. Mit Ausnahme von CB15 erwiesen sich die Peptide als identisch mit einzelnen aus Fragment $\alpha 3$ erhaltenen BrCN-Peptiden (Tab.11). Peptid CB15 (6 Reste) enthielt kein Homoserin und konnte deshalb dem C-Terminus von Fragment P4' zugeordnet werden. Seine Zusammensetzung entspricht bis auf das fehlende Homoserin der von Peptid CB14 (7 Reste) aus Fragment $\alpha 3$. Es ist wahrscheinlich, daß Pepsin bei der Abspaltung von Fragment P4' aus $\alpha 3$ auch den C-Terminus um einen Methioninrest verkürzte (vgl. u.a. mit dem Befund für das C-terminale BrCN-Peptid CB10 aus Fragment P2).

2.5.3. Bromcyanpeptide von Fragment P4

Ein weiteres Pepsinfragment P4 mit einem etwas geringeren Molekulargewicht als P4' konnte aus zwei Abbauversuchen der Tumormatrix gewonnen werden. Das nach Reduktion und Spaltung mit BrCN erhaltene Peptidprofil über Sephadex G75 war fast identisch mit dem von Fragment P4'. Sieben Peptide wurden nach chromatographischer Reinigung der Sephadex-Fraktionen erhalten. Im Vergleich mit Fragment P4' fehlte in P4 das Peptid CB6 (57 Reste). Dagegen ließ sich ein neues Tripeptid CB16 isolieren (s.Anhang zu Tab.10), das durch Sequenzanalyse dem N-terminalen Ende von Fragment P4 zugeordnet werden konnte. Vermutlich entstammt CB16 dem C-Terminus von Peptid CB6 in P4', welches also eine pepsinsensitive Region vor Position 55 besitzen sollte.

Die Verknüpfung der $\alpha 3$ -Fragmente über Disulfidbrücken legt die Vermutung nahe, daß $\alpha 3(IV)$ Ketten die molekulare Organisation $(\alpha 3(IV))_3$ aufweisen. Zur weiteren Überprüfung wurde P4 zusammen mit P4' an Ionenaustauschern in niedrigen molaren Puffern bei 15⁰, d.h. unter Bedingungen, die die tripelhelikale Konformation intakt halten, weitestgehend frei von anderen Fragmenten gewonnen.

Durch Edman-Abbau konnten ca. 100 (25%) der Positionen von Fragment P4 identifiziert werden (Abb.28). Fragment P4 beginnt N-terminal mit einer nichttripelhelikalen Sequenz (6 Positionen). Die Bestimmung der ersten 30 Sequenzpositionen in Fragment P4 legte bereits die Reihenfolge der Peptide CB16 (3 Reste)-CB13 (17 Reste)-CB1 (266 Reste) am N-Terminus fest. Mit Peptid CB15 (6 Reste) als C-Terminus verbleiben somit nur noch drei BrCN-Peptide für die Einordnung in den zentralen Bereich von Fragment P4 .

Einen entscheidenden Beweis für die Verwandtschaft der Fragmente P4, P4' und $\alpha 3$ erbrachte schließlich die identische N-terminale Sequenz von Peptid CB1 (266 Reste) aus P4 und $\alpha 3$.

Abb. 28 : Sequenzdaten von Fragment P4 und einigen Bromcyanpeptiden von P4 und $\alpha 3$ aus der $\alpha 3(\text{IV})$ -Kette des Maustumors

P4	Phe-Asp-Met-XXX-Leu-XXX-Gly-Asp-Gln-Gly- ¹⁰ Asp-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Met- ²⁰ Hyp-Gly-Arg-Ala-Gly-XXX-Hyp-Gly-XXX-Asp ³⁰
P4CB1	Hyp-Gly-Arg-Ala-Gly-Thr-Hyp-Gly-Arg-Asp-Gly-XXX-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly ²⁰
$\alpha 3\text{CB1}$	Hyp-Gly-Arg-Ala-Gly-Thr-Hyp-Gly-Arg-Asp-Gly-Pro-XXX-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly
$\alpha 3\text{CB2}$	Pro-Leu-Hyp-Glu-XXX-Hyp-Asp-XXX-Gly-Tyr-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-XXX-Gly-Gly-Glu- ²⁰ Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly
P4CB7	Gly-Thr-Hyp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Thr-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Glu- ²⁰ XXX-Gly-Asp-Glu-Gly-Leu-Hyp-Gly-XXX-Thr-Gly-Pro ³⁰
P4CB8	Hyp-Gly-Pro-XXX-Gly-Asp-XXX-Gly-Ser-Gln-Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Thr-Gly-Gln-Ser-Gly- ²⁰ Leu-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Gln-Gln-Gly-XXX-Hyp-Gly ³⁰
P4CB13	Ser-Leu-Hyl-Gly-Asp-Gln-Gly-Asp-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Met ¹⁰

zu Abb. 28 : s. auch Erläuterung zu Abb. 17 . Nichttripeptidhelikale Segmente d
sind unterstrichen. Der nichttripeptidhelikale Glycinrest in
Position 18 von Peptid CB2 könnte auch durch Deletion von
XV-Resten nach Pos. 18 entstanden sein.

3. Diskussion

Das Pepsinfragment P1 entstammt der C-terminalen Hälfte der $\alpha 1(IV)$ Kette des Basalmembrankollagens. Die Anwendung verschiedener proteolytischer und chemischer Abbauprozessuren auf das P1 der Maus erlaubte die Identifizierung von mehr als 70% oder 373 der 527 Sequenzpositionen des Fragmentes.

Die zehn Bromcyanpeptide und die sechs primären tryptischen Peptide konnten eingeordnet werden. Fragment P1 aus der bovinen Linsenkapsel zeigte in den wesentlichen Bereichen eine beträchtliche Homologie zum Mausfragment P1. Die parallele Untersuchung beider Fragmente war u.a. dann hilfreich, als die Reihenfolge CB6-CB1 durch das Linsenkapselpeptid CB6-1 bestätigt werden konnte.

Das vorherrschende Strukturelement in P1 ist das repetitive Triplet Gly-X-Y. Diese Sequenz wird an dem Amino- und Carboxylende des Fragmentes mit den Positionen 1-8 und 521-527 unterbrochen, den Spaltstellen für Pepsin. Weitere nichttripelhelikale Bereiche wurden zentral in P1 gefunden. Sie sind interpretierbar als Insertion bzw. Deletion von ein bis zwei Aminosäuren (s.auch Abb.29).

Derartige Unterbrechungen sind mit der Ausbildung einer ungestörten tripelhelikalen Struktur unvereinbar. Die α -Ketten interstitieller Kollagene (Typ I, II und III, Tab.1), die eine starre und pepsinresistente Tripelhelix ausbilden, weisen eine regelmäßige Sequenz mit einem Glycin an jeder dritten Position auf. Für das Basalmembrankollagen konnte auch elek-

tronmikroskopisch gezeigt werden, daß sonst tripelhelikale Fragmente an definierten Stellen ihre lineare Ausrichtung ändern (Glanville et al., 1981). Diese Stellen lassen sich mit dem durch Pepsinabbau erzeugten Spaltmuster korrelieren. Sie ermöglichen dem Molekül vermutlich eine größere Flexibilität, die schon durch das Netzwerkmodell des Typ IV Kollagens nahegelegt wird (Timpl et al., 1981; Abb.2). Die nichttripelhelikalen Segmente scheinen genetisch besonders konserviert zu sein, da homologe Pepsinfragmente aus verschiedenen Geweben und Spezies erhältlich sind (Bornstein und Sage, 1980; Glanville, 1981). Untersuchungen an dem Bromcyanpeptid CB5 zeigten, daß dies auch für die kurzen Sequenzunterbrechungen gilt, die normalerweise nicht durch Pepsin gespalten werden (Abb.29).

MAUS POS.114 ff	Gly-Leu-Hyp-Gly-Ile-Gly-Ile-Hyp
	G X Y G X G X Y
MAUS POS.289 ff	Gly-His-Pro-Val-Glu-Gly-Pro-Pro
	G X Y X Y G X Y
BOVIN POS.289 ff	Gly-His- Gln-Asp-Gly-Pro-Z
	G X X Y G X Y
HUMAN CB6 *	Gly-Z-Ala-Thr-Glu-Gly-Pro-Z
	G X Y X Y G X Y

Abb.29 : Unterbrechungen der Triplettssequenz Gly-X-Y in zentralen Bereichen des Fragmentes P1 aus Maustumor und boviner Linsenkapsel. Die Sequenzdaten für das Humanpeptid CB6 aus Plazenta (Babel und Glanville, pers. Mitteilung) zeigen ebenfalls Homologie zur Maussequenz. "Z" stellt einen nicht identifizierten Rest dar.

Bei dem Maustumor und der Humanplazenta sind es zwei Aminosäuren, für die Linsenkapsel nur eine Aminosäure, die die reguläre Sequenz unterbrechen. Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Pepsin zwischen Basalmembrankollagen des gleichen Kettentypus aus verschiedenen Spezies liegen möglicherweise an einem solchen geringfügigen Aminosäureaustausch.

Kürzlich haben Studien über die Struktur des Prokollagen Typ I Genoms gezeigt, daß die meisten Exons, die für die tripelhelikale Domäne kodieren, 54 oder 108 Basenpaare besitzen (Ohkubo et al., 1980; Yamada et al., 1980). Dies führte zu der Vermutung, daß das Kollagen Genom sich durch Duplikationen aus einem Urgen von 54 Basenpaaren entwickelt hat. Das entspricht 18 Aminosäuren oder sechs Triplets der Sequenz Gly-X-Y. Der erste kontinuierliche tripelhelikale Bereich in Fragment P1 (Pos. 9-116) umfasst nun gerade 108 Aminosäuren oder sechs dieser postulierten Ureinheiten. Die erarbeiteten Sequenzdaten des Basalmembrankollagens sollten einige Anhaltspunkte für die Untersuchungen über die Evolution und Regulation des Kollagen Genoms geben.

Ein Vergleich der Sequenzdaten aus Fragment P1 der Maus und der Linsenkapsel wies für den bevorzugten Aminosäureaustausch Ähnlichkeiten zu den interstitiellen Kollagenen auf (Fietzek und Kühn, 1976; Glanville und Kühn, 1979). Häufig gegeneinander ausgetauscht sind die Reste Serin,

Alanin und Prolin. In den Gruppen hydrophober, basischer oder saurer Aminosäuren beobachtet man den Austausch seltener, zwischen diesen Gruppen kaum.

78 homologe Tripletts beider P1-Fragmente (ca. 45% der Sequenz) wiesen in den Positionen X und Y eine Identität von 80% auf (vgl. Abb.22), 75% davon in X und 85% in Y. Für die $\alpha 1(I)$ Kette von Ratte, Huhn und Kalb wurde eine interspezies-Identität der X/Y-Positionen von ca. 95% gefunden (Fietzek und Kühn, 1976). Eine etwa 80%-ige Identität besteht zwischen den genetisch distinkten $\alpha 1(I)$ und $\alpha 1(II)$ Ketten einer Spezies (Butler et al., 1977). Wenn auch die Zahl der verglichenen Tripletts gering ist, so deutet sich doch an, daß das Kollagen Typ IV Genom einem wesentlich geringeren Selektionsdruck für die Ausbildung einer unveränderlichen kovalenten Struktur unterlag als z.B. das Kollagen Typ I Genom.

Einige der analysierten Sequenzen sind charakteristisch für Typ IV Kollagen, z.B. das Triplett Gly-Asp-Gln, welches fünfmal in Fragment P1 auftaucht. Auffällig ist auch die Konzentration sonst seltener Aminosäuren wie Isoleucin in P1 um Position 120 bzw. 370 sowie Phenylalanin um Position 340 bzw. 470. Das helixstabilisierende 4-Hydroxyprolin (Sakakibara et al., 1973) fehlt in den ersten 31 Positionen, also in der Nähe der N-terminalen Pepsinspaltstelle.

Tab.12 illustriert die Verteilung von Aminosäureresten der untersuchten Pepsinfragmente des Basalmembrankollagens in

der X- oder Y-Position des Triplets Gly-X-Y . Einige der Befunde lassen sich bereits anhand der allgemeinen Aminosäuredaten vermuten. So das verminderte Auftreten von Prolin in Position X, dafür vermehrt Hydroxyprolin in Y; weniger Lysin in X und Y, mehr Hydroxylysin in Y; wenig Alanin und Arginin in X und Y, dafür vermehrt die hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Phenylalanin in Position X . Besonders unterscheiden sich beide Fragmente P1 von den interstitiellen Kollagenen in der fast ausschließlichen Lokalisation der Serinreste in Position X, in der Sequenz meist gefolgt von einem Hydroxyprolin oder Glutamin. Das helixstabilisierende Prolin, besonders der Sequenz Gly-Pro-Hyp (Sakakibara et al., 1973) wurde hier wahrscheinlich durch ein Serin ersetzt, eine ohnehin häufige Substitution (Fietzek und Kühn, 1976). Die Helix würde so weniger stabil sein und neben den nichttripelhelikalen Bereichen (s.o.) weiter zur größeren Elastizität des Typ IV Netzwerkes (Abb.2) beitragen.

Eine Helixstabilisierung wird auch der Konstellation einer sauren Aminosäure (Asp, Glu) in Position X mit einem basischen Rest (Arg, Lys) in Position Y des vorangehenden oder nachfolgenden Triplets zugeschrieben (Traub und Fietzek, 1976). Da das untersuchte Basalmembrankollagen wesentlich weniger Arginin- und Lysinreste in Position Y besitzt, wäre dies ein weiterer Beleg für eine verminderte Stabilität der Moleküle. Gehäuft in derartigen Y-Positionen finden

Tab.12 : Verteilung von Aminosäureresten auf die Positionen X und Y des Triplets Gly-X-Y in den sequenzierten Bereichen der Fragmente P1(Maus), P1(Linse), P2(Maus) und P4(Maus) im Vergleich mit $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ u. $\alpha 1(III)$ aus Kalbshaut (Glanville und Kühn, 1979)

Kette/Fragment % sequenziert (Zahl analysierter Triplets)	$\alpha 1(I)$ 100 (338)		$\alpha 2(I)$ 100 (338)		$\alpha 1(III)$ 100 (337)		P1(Maus) 70 (123)		P1(Linse) 45 (78)		P2(Maus) 35 (54)		P4(Maus) 25 (34)	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
Hydroxyprolin	1	113	-	99	-	142	2	55	2	37	-	22	-	18
Asparaginsäure	16	14	9	13	11	6	12	4	9	3	2	-	6	2
Asparagin	7	6	13	10	6	17	1	2	1	-	-	-	-	-
Threonin	2	14	9	11	6	8	5	3	2	1	2	2	3	2
Serin	15	17	16	18	27	18	17	2	8	-	3	2	2	1
Glutaminsäure	43	7	39	4	44	2	8	1	4	1	1	1	-	-
Glutamin	6	18	8	15	9	15	8	11	6	10	3	7	4	4
Prolin	119	4	104	3	99	2	22	2	13	-	7	1	5	-
Glycin	1	1	2	-	15	2	-	1	-	1	2	-	-	-
Alanin	61	60	50	58	46	37	2	4	4	2	2	1	-	1
Valin	8	8	9	25	8	4	8	3	4	3	7	-	-	-
Methionin	2	5	-	4	5	4	2	5	3	4	3	4	2	1
Isoleucin	4	4	10	8	9	4	6	2	6	-	4	4	-	-
Leucin	18	1	30	4	15	1	16	-	6	-	11	2	6	-
Tyrosin	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-
Phenylalanin	12	-	11	1	9	-	8	-	6	-	5	-	1	-
Histidin	2	-	7	1	8	-	3	-	2	-	-	1	-	-
Hydroxylysin	-	4	-	9	-	5	-	23*	-	15*	-	5*	-	4*
Lysin	12	20	8	11	12	20	1	-	1	-	-	-	-	-
Arginin	9	42	11	44	9	41	1	4	-	1	-	1	2	1

Nichttripelhelikale Bereiche wurden nicht einbezogen. *Werte für Hydroxylysin geschätzt (s. 2.2.7.).

sich aber glykosylierte Hydroxylysinreste. Ihre Wechselwirkung mit den sauren Aminosäuren in den benachbarten X-Positionen ist jedoch noch unklar.

Die interstitiellen Kollagene besitzen ein hohes Maß an intramolekularer Homologie. So können Anhäufungen hydrophober Aminosäuren um ca. 230 Reste entlang der Kette versetzt gefunden werden. Diese Distanz entspricht der D-Versetzung der Tripelhelix bei der Fibrillenbildung und ermöglicht eine spezielle Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Molekülen (Fietzek und Kühn, 1976). Obwohl von Basalmembrankollagen keine Fibrillenbildung erwartet wird, sind in Fragment P1 z.B. die 3-Hydroxyprolinreste (Pos. 275 und 504) sowie Segmente mit drei bis vier Phenylalaninresten (um Pos. 245 und 480) über eine Distanz von ca. 230 Resten voneinander getrennt. Ob derartige Beobachtungen Bedeutung besitzen, muß in weiteren Sequenzuntersuchungen bestätigt werden.

Typ IV Kollagen unterliegt in besonderem Maße der posttranslationalen Hydroxylierung. 4-Hydroxyprolin konnte in Fragment P1, wie aus den Sequenzdaten der interstitiellen Kollagene zu erwarten war, nur in der Y-Position des Triplets Gly-X-Y gefunden werden. Die Prolinreste in der Position Y sind in Fragment P1 fast vollständig hydroxyliert. Die einzige nicht hydroxylierte Gly-Pro-Pro-Sequenz findet sich in Position 294-296. Weitere unmodifizierte Prolinreste in Y gibt es in den Positionen 56, 172 und 214. In einigen Fällen sind sie teilweise hydroxyliert wie in den Positionen 89 und 175.

Der einzige 3-Hydroxyprolinrest, der zuvor durch Sequenzanalyse bestimmt worden war, befindet sich (mit einem Hydroxylierungsgrad von 20%) nahe dem C-Terminus der $\alpha 1(I)$ Kette in einer X-Position (Fietzek und Kühn, 1976). Die Spezifität der 3-Prolyl-Hydroxylase für die Position X des Triplets Gly-X-Y konnte für zwei Bereiche in Fragment P1 aus dem Mautumor und der Linsenkapsel, die sehr homolog sind, belegt werden. Hier besetzt 3-Hydroxyprolin die Positionen 275 (mit einem Hydroxylierungsgrad von ca. 30%) und 504 (mit einem Hydroxylierungsgrad von ca. 90%). Die Umgebungen der Positionen 275 und 504 sind sich mit der Sequenz Gly-Phe-Met(4-Hyp)-Gly-3-Hyp-4-Hyp-Gly-Pro auffällig ähnlich. Interessant ist auch die Beobachtung, daß die 3-Prolyl-Hydroxylase an der 17. Aminosäure nach dem Aminoende einer Unterbrechung des tripelhelikalen Bereiches angreift. Offenbar hat hier das Enzym mehr Zeit, sein Substrat umzusetzen, bevor sich die Tripelhelix in situ neu formt und sich dem Einfluß des Enzyms entzieht. Eine umfangreichere 3-Hydroxylierung interstitieller Kollagene wurde beobachtet, wenn die Ausbildung der Tripelhelix durch biosynthetischen Einbau von Prolinanaloga in die naszierenden α -Ketten verzögert wurde (Majamaa, 1981).

Glycinärmere, N-terminale Fragmente des Typ IV Kollagen enthalten relativ mehr 3-Hydroxyprolin. Die Signifikanz einer Korrelation von Unterbrechungen der Tripelhelix mit dem vermehrten Auftreten von 3-Hydroxyprolin muß sich noch anhand zusätzlicher Sequenzdaten zeigen.

Hydroxylysin repräsentiert eine weitere posttranslationale Modifikation, die nur in der Y-Position gefunden wird. Aus bereits genannten Gründen (Abschnitt 2.2.7.) kann diese Aminosäure nicht im Edman-Abbau identifiziert werden. Durch Aminosäureanalyse kleiner Spaltpeptide konnte die Lokalisation von Hydroxylysin in den erwarteten Y-Positionen wahrscheinlich gemacht werden (z.B. Pos. 370 in Peptid PlCB6). Von den bekannten Kollagenen enthält das Typ IV Kollagen den höchsten Prozentsatz (3-7%) an dieser Aminosäure. Es liegt nahe, die verminderte Fähigkeit zur Fibrillenbildung mit den raumfordernden, aus der Tripelhelix nach aussen gerichteten glykosylierten Hydroxylysinresten in Verbindung zu bringen. Knorpelkollagen Typ II mit bereits ca. 1.5% Hydroxylysin formt in vivo nur dünne Fibrillen, während für Typ I Kollagen mit 0.5% Hydroxylysin dicke Fibrillen charakteristisch sind. Tatsächlich bildet Typ IV Kollagen in vivo (s. Netzwerkmodell in Abb.2) und auch in vitro keine Fibrillen aus. Welche Funktion das gehäufte Auftreten von Hydroxylysin in Fragment P1 nahe dem N-Terminus (mit drei Resten) und um den nicht tripelhelikalen Bereich nach Position 116 (mit 5-6 Resten) hat, ist noch unklar.

Als Vertreter der $\alpha 2(IV)$ Kette des Tumorbasalmembrankollagens konnte Fragment P2 anhand seiner Bromcyanpeptide und ca. 35% seiner Sequenz charakterisiert werden. In Analogie zu Fragment P1 ist seine Lokalisation am C-Terminus

der $\alpha 2(IV)$ Kette wahrscheinlich. Am Amino- und Carboxy-ende sowie in zwei zentralen BrCN-Peptiden fanden sich Unterbrechungen der Tripelhelix. Eine große Unterbrechung, entsprechend einer Insertion von sechs Aminosäuren, ist in dem zentralen Peptid CB3 enthalten.

In den sequenzierten Bereichen von Fragment P2 konnten keine Homologien zu Fragment P1 entdeckt werden. Die Verteilung einzelner Aminosäuren auf die X/Y-Positionen (Tab.12) des Triplets Gly-X-Y zeigt besonders für einige hydrophobe Reste Unterschiede zu P1.

Die vorliegenden primärstrukturellen Daten bestätigen den Eindruck, daß es sich im Falle von $\alpha 2(IV)$ mit seinem niedrigen Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin und seiner größeren Proteasesensibilität um ein weniger stabiles Genprodukt des Basalmembrankollagens handelt.

Die Fragmente P4, P4' und $\alpha 3$ aus dem Basalmembrankollagen des Maustumors wurden bisher in keinem anderen Gewebe gefunden. Auffällig ist der hohe Gehalt an Hydroxyprolin in diesen Fragmenten. Während das Muster der BrCN-Peptide von P4 und P4' als komplett gelten kann, ist das Ergebnis für das größere $\alpha 3$ -Fragment wegen der geringen Materialmengen noch mit Unsicherheiten behaftet.

Ca. 25% der Sequenzpositionen von Fragment P4 wurden bestimmt und vier der sieben BrCN-Peptide konnten bereits in ihrer Reihenfolge eingeordnet werden. Eine Unterbre-

chung der Tripelhelix wurde am N-Terminus von P4 (sechs Positionen) und in Peptid CB2 aus $\alpha 3$ (acht bzw. eine Position) gefunden. Bemerkenswert in Peptid CB2 ist das Auftreten von zwei 4-Hydroxyprolinresten in den analysierten nichttripelhelikalen Segmenten.

Die Fragmente P4, P4' und $\alpha 3$ besitzen u.a. gemeinsam das größte BrCN-Peptid CB1 (266 Reste), wie durch Sequenzanalyse gezeigt wurde. Dies führte auch zum postulierten Fragmentierungsschema des dritten Kettentypus $\alpha 3(IV)$ des Basalmembrankollagens (Abb.25).

Ein Sequenzvergleich zwischen Fragment P1 und P4 zeigt eine gewisse Homologie von Peptid P4CB7 Pos. 1-11 mit P1 Pos. 149-159 und von P4CB7 Pos. 13-27 mit P1 Pos. 170-184. Inwieweit diese Homologie signifikant ist, läßt sich noch nicht beurteilen. Als ebenso vorläufig muß die X/Y-Verteilung der Aminosäurereste von Fragment P4 (Tab.12) betrachtet werden.

Die Frage, inwieweit $\alpha 1(IV)$ und $\alpha 2(IV)$ in demselben Molekül vorkommen, ist noch kontrovers. Es gibt Hinweise, daß sie sowohl in einer Tripelhelix der Zusammensetzung $(\alpha 1(IV))_3$ als auch $(\alpha 2(IV))_3$ vorliegen können (Timpl et al., 1979). Andere Autoren berichten über eine Tripelhelix der Formel $(\alpha 1(IV))_2 \alpha 2(IV)$ (Mayne und Zettergren, 1980).

Die Zuordnung von $\alpha 3(IV)$ ist noch völlig unklar. Erste Ergebnisse legen eine Organisation in Form von $(\alpha 3(IV))_3$ nahe (Abschnitt 2.5.3.).

In Fragment P2 deuteten bereits der niedrigere Gehalt an Glycin und einige Sequenzdaten darauf hin, daß hier größere zentrale Unterbrechungen der Tripelhelix vorliegen. Die Fragmente P4 und $\alpha 3$ aus der $\alpha 3(IV)$ Kette scheinen dagegen Vertreter eines stabileren Typs des Basalmembrankollagens zu sein, da sie vermehrt erst bei schärferem Pepsinabbau anfallen und auffällig viel Hydroxyprolin enthalten. Ob $\alpha 2(IV)$ und $\alpha 3(IV)$ quantitativ variierebare Genprodukte zur Regulation der Steifheit von Basalmembranen sind, bleibt offen. Eine weitergehende Sequenzanalyse dieser Fragmente, insbesondere auch ihrer nichttripelhelikalen Segmente, sollte eventuelle Homologien zu $\alpha 1(IV)$ aufdecken und die noch ungelöste Frage der Organisation und Regulation für die Ausbildung der Typ IV Tripelhelix klären helfen.

4. Zusammenfassung

- 4.1. Fragment P1 aus der C-terminalen Hälfte der $\alpha 1(IV)$ Kette von Typ IV Kollagen wurde aus einem Maustumor isoliert und mittels Bromcyan und Proteasen gespalten. Die Spaltpeptide wurden gereinigt und in ihrer Größe, Zusammensetzung und ca. 70% der Sequenz charakterisiert.
- 4.2. Die Ergebnisse zeigen, daß Fragment P1 aus ca. 530 Aminosäuren besteht. Die Sequenzanalysen von überlappenden Peptiden erlaubte die eindeutige Zuordnung der Positionen der zehn Bromcyanpeptide und von sechs tryptischen Peptiden innerhalb des Fragmentes.
- 4.3. Der größte Teil der Sequenz besteht aus der Tripletstruktur Gly-X-Y, die charakteristisch für die Tripelhelix ist. Unterbrechungen dieser regulären Sequenz finden sich am Carboxyl- und Aminoende wie auch in zwei zentralen Bereichen des Fragmentes und weisen auf eine diskontinuierliche tripelhelikale Konformation hin. Zwei Reste von 3-Hydroxyprolin sind in Segmenten mit beträchtlicher Sequenzhomologie nahe solchen Unterbrechungen lokalisiert.
- 4.4. Analoge Untersuchungen an Spaltpeptiden des Fragmentes P1 aus boviner Linsenkapsel führten zur Identifizierung von ca. 45% der Sequenzpositionen und zeigen

eine hohe Homologie zu dem Mausfragment. Die Fragmentmuster sind leicht unterschiedlich infolge von ein bis zwei Substitutionen von Methionin und Arginin. Der Vergleich von jeweils 78 Tripletts in den Sequenzpositionen X und Y zeigt 80% Identität mit dem Mausfragment. Eine Unterbrechung der Tripletstruktur konnte in beiden Fragmenten an der gleichen Position im zentralen Bereich lokalisiert werden, enthielt jedoch unterschiedliche Aminosäuren.

4.5. Weitere Untersuchungen befaßten sich mit dem Pepsinfragment P2, das eine ähnliche Größe wie Fragment P1 besitzt, aber aus der strukturell und genetisch differentiellen $\alpha 2(IV)$ Kette des Maus Typ IV Kollagen stammt. Fragment P2 ließ sich durch Bromcyan in zehn Peptidspalten, die in Größe, Zusammensetzung und N-terminaler Sequenz unterschiedlich zu denen von P1 waren. Obwohl P1 und P2 wahrscheinlich aus homologen Abschnitten der $\alpha 1(IV)$ und $\alpha 2(IV)$ Kette stammen, weisen sie nur eine geringe Strukturhomologie auf.

4.6. Die Fragmentierungsanalyse weiterer Pepsinfragmente aus dem Maustumorkollagen ($\alpha 3$, P4, P4') zeigte gemeinsame Strukturelemente, jedoch kaum Homologie zu den Fragmenten P1 und P2. Die Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis, daß Typ IV Kollagen einen dritten Typ von konstitutioneller Kette, $\alpha 3(IV)$, besitzt.

5. Material und Methoden

5.1. Ausgangsmaterial

5.1.1. Aufbereitung des Tumorgewebes

Das EHS-Sarkom (Orkin et al., 1977) wurde durch subkutane Passagen von Gewebehomogenat in C57Bl-Mäusen propagiert. Die Tumoren (5-15 g) wurden nach Homogenisieren drei Mal mit dem 20-fachen Volumen 3.4M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4 bei 4° in Gegenwart der Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid und p-Hydroxymercuribenzoat (je 50 mg/l) vorextrahiert, um Blut und nicht-kollagene Zellproteine zu entfernen. Abb.30 schematisiert die nachfolgenden Extraktionsschritte, bestehend aus einer Neutralsalzextraktion mit 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4 und einer Behandlung mit 0.5M Essigsäure. Der verbleibende Rückstand wurde lyophilisiert und bildete das Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Pepsinfragmente des Typ IV Kollagens.

5.1.2. Pepsinabbau des vorextrahierten Tumorgewebes und Fraktionierung mit NaCl

10-30 g des Rückstandes wurden in 0.5M Essigsäure suspendiert (ca. 1 g pro 40 ml), der pH mit HCl auf 2.5 eingestellt, erneut homogenisiert und mit Pepsin (Boehringer/Mannheim aus Schweinemucosa, 2500 Anson Units/g im Enzym : Substrat-Verhältnis 1:20) 24 h bei 15° inkubiert. Alle weiteren Operationen erfolgten bei 4°. Das im Überstand befindliche kollagene Protein wurde nach Fällung mit 10% NaCl in

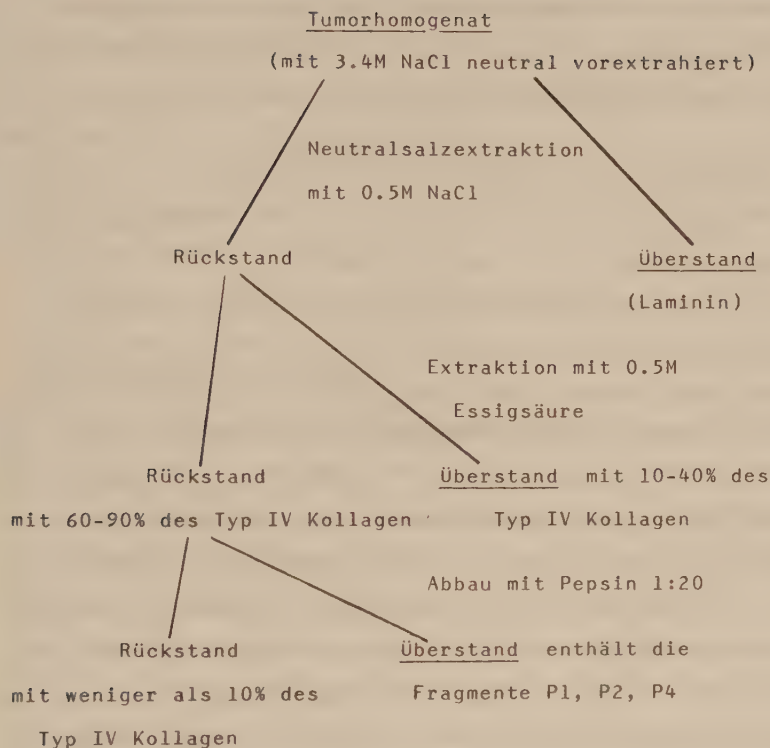


Abb.30 : Gewinnung von löslichen Fraktionen aus dem Mausem-
tumor. Die in den Fraktionen enthaltenen Haupt-
komponenten sind jeweils angegeben.

0.1M Essigsäure aufgenommen und ausreichend gegen 0.5M NaCl,
50mM Tris-HCl pH 7.4 dialysiert. Ausgefallene Verunreinigungen
wurden durch Zentrifugation entfernt. Fraktionierte Fällung mit
NaCl erfolgte dann bei Konzentrationen von 1.3M, 1.6M und 2M .

Nach mindestens vierstündigem Rühren wurden die Präzipitate durch Zentrifugation abgetrennt, in 0.1M Essigsäure gelöst, ausgiebig gegen Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

5.1.3. Reinigung der Fragmente P1, P2, P4 und $\alpha 3$

Die 1.6M und 2M NaCl Fällungen enthielten die Hauptmenge des Basalmembrankollagen und wurden über Agarose A 1.5m in die hochmolekulare, disulfidvernetzte Fraktion 1 (u.a. mit $\alpha 3$) und die niedermolekulare Fraktion 2 (mit P1, P2 und P4) aufgetrennt. Aus Fraktion 1 konnte $\alpha 3$ nach Reduktion und Alkylierung durch zweimalige Rechromatographie über Agarose A5m in ca. 85% Reinheit gewonnen werden. P1 ließ sich von Fragment P2 durch CM-Zellulosechromatographie (Citrat-System, s.u.) separieren. Das basischere P2 eluiert später im Gradienten als P1, hochmolekulares Material dagegen noch später. Fragment P4, welches in diesem System mit P1 chromatographiert, erscheint über DEAE-Zellulose (System 5mM Tris pH 8.6, s.u.) in der ungebundenen Fraktion und kann so von Fragment P1 getrennt werden, welches stärker zurückgehalten wird.

5.1.4. Gewinnung von Fragment P1 aus der bovinen Linsenkapsel

Das Gemisch von P1 und P2 aus boviner Linsenkapsel, eine Gabe von Dr.S.N.Dixit (Memphis, University of Tennessee, USA), wurde, wie in Abschnitt 11.1.3. angegeben, aufgetrennt. Der Pepsinabbau der Linsenkapseln und die Gewinnung der Basalmembranfraktionen sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Dixit, 1978): die Linsenkapseln wurden in flüssigem N_2 eingefroren,

pulverisiert, vorextrahiert und bei 4° und pH 2.5 40 h lang mit Pepsin im Enzym : Substrat-Verhältnis 1:10 abgebaut. Nach fraktionierter Fällung mit NaCl ähnlich dem in Abschnitt 11.1.2. geschilderten Verfahren, konnten Fragment P1 und P2 als niedermolekulare, nicht disulfidvernetzte Fraktion über Agarose A5m erhalten werden.

5.2. Chemische und proteolytische Abbaumethoden

5.2.1. Spaltung mit Bromcyan

Vor ihrer Spaltung mit Bromcyan wurden Peptide nach der Methode von Adelstein und Kuehl (1970) reduziert, um nicht spaltbares Methioninsulfoxid in Methionin umzuwandeln. 2 mg Protein wurden in 1 ml 0.2M NaHCO₃ pH 7.0 in der Gegenwart von 25% Merkaptoäthanol (Sigma) 20 h lang unter N₂ bei 45° inkubiert. Die über Biogel P2 entsalzte, dann lyophilisierte Probe wurde unter N₂ in 1 ml 70% Ameisensäure gelöst, mit dem doppelten Gewicht an Bromcyan (p.A. Schuchard) versetzt und 16 h lang bei 30° oder 4 h lang bei 37° abgebaut.

5.2.2. Spaltung mit Trypsin

Die tryptischen Spaltungen erfolgten in einem Enzym(Trypsin-TPCK, Worthington) : Substrat-Verhältnis (w/w) von 1:100 in 0.2M NH₄HCO₃ pH 7.9 4 h lang bei 37° oder 30° (Fragment P1 aus der Linsenkapsel). Die Abbauten wurden durch die Zugabe von N(p-Tosyl)-Lysyl-Chloromethylketon (TLCK, Sigma) gestoppt.

5.2.3. Spaltungen mit Thermolysin

Die Peptide wurden mit Thermolysin (aus *Staphylococcus thermolyticus*, Boehringer/Mannheim) in 0.2M NH_4HCO_3 pH 7.9 4 h lang bei 37° gespalten. Das Enzym : Substrat-Verhältnis (w/w) betrug 1:10 (CB4, CB5), 1:100 (CB1, CB2, CB5, T1) oder 1:1000 (T2).

5.2.4. Reduktion und Alkylierung

Reduktion und Alkylierung des hochmolekularen Typ IV Kollagen erfolgten mit Dithioerythrit und Äthylenimin nach der Methode von Gollwitzer et al. (1974).

5.3. Chromatographische Methoden

5.3.1. Molekularsiebe

a.) Biogel P2 100-200 mesh zum Entsalzen. Säulenvolumina 30-250 ml, Durchfluß 200-500 ml/h. In 0.5M Essigsäure.

b.) Biogel P2 200-400 mesh zur Trennung kleiner Peptide. Säulenmaße 1.5x90 cm, Durchfluß 11 ml/h. In 0.5M Essigsäure.

c.) Biogel P4 200-400 mesh. Säulenabmessung 1.5x100 cm, Durchfluß 13 ml/h. In 0.2M NH_4HCO_3 pH 7.9 .

d.) Biogel P10 200-400 mesh. Säule 1.5x100 cm, Durchfluß 8 ml/h. In 0.2M NH_4HCO_3 pH 7.9 .

a.)-d.) von Biorad Laboratories, München

e.) Sephadex G50 sf. Säule 1.5x110 cm, Durchfluß 24 ml/h.

In 0.2M NH_4HCO_3 pH 7.9 .

f.) Sephadex G75 sf. Säule 2x120 cm, Durchfluß 19-20 ml/h.

In 0.2M NH_4HCO_3 pH 7.9 .

e.)-f.) von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

g.) Agarose A1.5m 200-400 mesh. Säule 5x140 cm. Durchfluß

70 ml/h. In 1M CaCl_2 , 50mM Tris-HCl pH 7.5 .

h.) Agarose A5m 200-400 mesh. Durchfluß 30 ml/h bei Säulen-

maßen von 3.5x130 cm. In 1M CaCl_2 , 50mM Tris-HCl pH 7.5 .

g.)-h.) von Biorad Laboratories, München

5.3.2. Ionenaustauscherchromatographie

a.) Carboxymethylzellulose CM52. Säule 1.5-2.5x10-25 cm,

Durchfluß 40-80 ml/h, Temperatur 42°. In Citrat-Puffer nach

Butler et al. (1976); Stammlösung : 1.9 g Na_2 -Citrat ($2 \text{ H}_2\text{O}$),

2.86 g Citronensäure ad 1000 ml (pH 3.6). Linearer Gradient

mit NaCl von 0.04-0.14M.

b.) Diäthylaminoäthylzellulose DE52. Säule 1.5x15 cm, Durch-

fluß 40 ml/h bei 15°. In 5mM Tris-HCl pH 8.6, 2M Harnstoff.

Linearer Gradient mit NaCl von 0-0.3M.

c.) Phosphozellulose P11 fibrous powder form. Säule 1-1.5x

6-15 cm, Durchfluß 30-70 ml/h, Temperatur 42°. In 5mM Na-

Azetat/Essigsäure pH 3.6 . Linearer Gradient mit NaCl von

0-0.3 (0.5)M.

a.)-c.) von Whatman/Vetter, Wiesloch

5.3.3. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Säule Vidac TP18, Reversed Phase. Druck um 60 Psi, Temperatur 55°. Phase A : 5mM NH_4 -Azetat pH 6.5 . Phase B : 5mM NH_4 -Azetat pH 6.5 in 80% Azetonitril. Linearer Gradient 0-50% Phase B. Zeitkonstante 1% pro min, Reequilibration durch absteigende Phase B in 10 min.

Fractionen aus HPLC wurden mit Hand gesammelt. Für die Molekularsieb- und Ionenaustauscherchromatographie bestand die verwendete Trenneinheit aus der Säule, einem kontinuierlich aufzeichnenden Spektralphotometer (Beckman oder Cecil) und einem Fraktionssammler (LKB Ultro Rac). Alle Säulenpuffer (mit Ausnahme von 0.2M NH_4HCO_3) wurden vor Gebrauch entgast, Harnstoff durch mehrstündiges Rühren der achtmolaren Stammlösung in bifunktionellem Austauschharz (Amberlite MB3, Serva) von Isocyanat- oder Carbamationen befreit.

5.4. Analytische Methoden

5.4.1. Aminosäureanalysen

2-50 μg Protein wurden unter N_2 bei 110° 20 h lang in 6M HCl hydrolysiert und im Anschluß einrotiert. Die HCl-Lösung wurde mit 0.1% (v/v) Merkaptoäthanol (Sigma) versetzt, was zu besseren Ausbeuten für Methionin und Tyrosin führt. Homoserinhaltige Peptide aus den Bromcyanspaltungen wurden nach der Hydrolyse mit 0.7 ml 1%-igem wässrigen Piperidin (Serva) bei 37° 1 h lang im Wasserbad inkubiert und nochmals einrotiert. Das erlaubte die quantitative Umwandlung von Homoserinlacton in Homoserin und somit genauere Molekulargewichtsbestimmungen.

Die Analyse erfolgte über einem Aminosäureanalysator der Fa. Durrum, Palo Alto, Calif. Werte für Threonin und Serin wurden wegen hydrolytischen Verlusten mit den Faktoren 1.08 bzw. 1.21 korrigiert.

5.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Fragmentgemische und größere Peptide wurden in Rundgelen (0.5x 6.5 cm) nach der Methode von Furthmayr und Timpl (1971) analysiert. Die Proben wurden durch Zusatz von 10% Merkaptoäthanol (Sigma) bei 50° 30 min lang im Wasserbad reduziert und direkt aufgetragen. Stromstärke pro Röhrchen 6-8 mA bei bis zu 26 Rundgelen pro Kammer und einer Elektrophoresedauer von ca. 3 h. Fixierung und Anfärbung der 5-7.5%-igen Gele 30-60 min lang in einer Lösung von 0.25% Coomassie Brilliant Blau in 20%-iger Trichloressigsäure. Entfärbung in 7% Essigsäure 1-3 Tage lang.

5.4.3. Molekulargewichtsbestimmungen

- a.) durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Bromcyanpeptiden des Typ I Kollagens (Kalb) als Eichsubstanzen.
- b.) durch Molekularsiebchromatographie (Sephadex G50, Sephadex G75, Biogel P4, Biogel P10, Agarose A1.5m, Agarose A5m) mit den α -Ketten und den Bromcyanpeptiden des Typ I Kollagens (Kalb) als Standard.
- c.) bei kleineren tryptischen oder Bromcyanpeptiden basierend auf Berechnungen für einen Rest Arginin, Lysin oder Homoserin pro Peptid. Zu Grunde gelegt wurde hier ein mittleres Molekulargewicht von 98 pro Aminosäure.

5.4.4. Sequenzanalyse

a.) N-terminale Sequenzierung

6-300 nmol Peptid wurden in einem Sequenator (Liquid Phase Sequencer, Modell Beckman 890c, Palo Alto, Calif.) nach der Methode von Edman und Begg (1967) sequenziert. Die angewandten Verfahren und Methoden der Identifizierung sind von Lottspeich (1980) beschrieben worden und seien in aller Kürze skizziert : Angewandt wurde das Quadrol-(Wyandotte Chemical Corp.) Verfahren in Gegenwart von 3 mg Polybrene. Nach Konvertierung der Anilinothiazolinon-Derivate in die beständigen Phenylthiohydantoin-Aminosäuren erfolgte die Identifizierung entweder I : per Dünnschichtchromatographie in zwei Laufmittelsystemen (hydrophob und hydrophil) oder II : per Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) mit einem SP 8000 Liquid Chromatograph (Spectra Physics, Darmstadt), Säule Beckman Ultro Spheres C18 im isokratischen System (Lottspeich, 1980).

Zur Identifizierung des noch unbekannten HPLC-Signals für 3-Hydroxyprolin wurde das Phenylthiohydantoin-Derivat einer Rückhydrolyse in 6M HCl für 4 h bei 150° oder für 20 h bei 110° unterworfen.

b.) C-terminale Sequenzierung

20-200 nmol Peptid wurden C-terminal auf 3-5 Schritte mit Carboxypeptidase Y (Merck, Darmstadt, 170 Units pro mg) sequenziert : Das Peptid (100 nmol gelöst in 1 ml H₂O bei 37°) wurde mit Carb-

oxypeptidase Y (0.1 mg gelöst in 0.1M Pyridiniumazetat pH 5.5 mit 50 µg Norleucin als internem Standard) gemischt und bei 37° inkubiert. Aliquots für die Aminosäureanalyse wurden nach 10, 30, 60 min und 4 bzw. 24 h entnommen, mit 6M HCl angesäuert und gleich lyophilisiert. Die Menge der freigesetzten Aminosäuren wurde auf den Norleucinstandard bezogen und graphisch gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

6. Referenzen

- Adelstein, R.S. and Kuehl, M.W., Structural Studies on Rabbit Sceletal Actin. I. Isolation and Characterization of the Peptides Produced by Cyanogen Bromide Cleavage. *Biochemistry* 9, 1355 (1970).
- Alitalo, K., Vaheri, A., Krieg, Th., and Timpl, R., Biosynthesis of two Subunits of Type IV Procollagen and of Other Basement Membrane Proteins by a Human Tumor Cell Line. *Eur. J. Biochem.* 109, 247 (1980).
- Bornstein, P. and Sage, H., Structurally Distinct Collagen Types. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 957 (1980).
- Butler, W.T., Finch, J.E. and Miller, E.J., The Covalent Structure of Cartilage Collagen; Evidence for Sequence Heterogeneity of Bovine $\alpha 1(II)$ Chains. *J. Biol. Chem.* 252, 639 (1977).
- Crouch, E. and Bornstein, P., Characterization of a Type IV Procollagen Synthesized by Human Amniotic Fluid Cells in Culture. *J. Biol. Chem.* 254, 4197 (1979).
- Dixit, S.N. and Kang, A., Anterior Lense Capsule Collagens : Cyanogen Bromide Peptides of the C-Chain. *Biochemistry* 18, 5686 (1979).
- Edman, P. and Begg, G., A Protein Sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1, 80 (1967).

- Ekblom, P., Lehtonen, E., Saxen, L., and Timpl, R., Shift in Collagen Type as an Early Response to Induction of the Metanephric Mesenchyme. *J. Cell Biol.* 89, 276 (1981).
- Farquar, M.G., Structure and Function in Glomerular Capillaries. In "Biology and Chemistry of Basement Membranes". Kafalides, N.A. (ed.). Academic Press, New York, 43 (1978).
- Fietzek, P. and Kühn, K., The Primary Structure of Collagen. *Intern. Rev. Conn. Tiss. Res.* 7, 1 (1976).
- Foldart, G.M., Bere, E.W., Yaar, M., Rennard, S.I., Gullins, M., Martin, G.R., and Katz, S.I., Distribution and Electron Microscopic Localization of Laminin, a Non-Collagenous Basement Membrane Glycoprotein. *Lab. Invest.* 42, 336 (1980).
- Furthmayr, H. and Timpl, R., Characterization of Collagen Peptides by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Electrophoresis. *Anal Biochem.* 41, 510 (1971).
- Glanville, R.W. and Kühn, K., The Primary Structure of Collagen; International Conference on Fibrous Proteins, New Zealand, 12.-16.2.1979 .
- Glanville, R.W., Recent Advances Made in Investigating the Molecular Structure of Collagens. *Conn. Tiss. Res.* 1 (1981).

- Glanville, R.W., Voss, T., and Kühn, K., in "New Trends in Basement Membrane Research". K.Kühn, R.Timpl and H.Schöne (eds.). Ravens Press, New York, in press.
- Gollwitzer, R., Becker, U., Timpl, R., Isolation and Chemical Characterization of Reduced and Aminoethylated Polypeptide Chains of Bovine Fibrinogen. FEBS Lett. 47(1), 177 (1974).
- Hay, E.D., Epithelium in Histology. Weiss, L. and Greep, R.O. (eds.). Mc Graw Hill Inc., p. 113 (1977).
- Heathcote, J.G., Sear, C.H.G., Grant, M.E., Studies on the Assembly of the Rat Lense Capsule. Biosynthesis and Partial Characterization of the Collagenous Components. Biochem. J. 176, 283 (1978).
- Hofmann, H., Fietzek, P., and Kühn, K., Comparative Analysis of the Sequences of the three Collagen Chains $\alpha 1(I)$, $\alpha 2$ and $\alpha 1(III)$. J. Mol. Biol. 141, 293 (1980).
- Jakus, M.A., in "Ocular Fine Structure". Little Brown Inc., Boston, 172 (1974).
- Kanwar, Y.S. and Farquar, M.G., Presence of Heparan Sulfate in the Glomerular Basement Membrane. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 76, 1303 (1979).

Kanwar, Y.S. and Farquar, M.G., Anionic Sites in the Glomerular Basement Membrane. In Vivo and in Vitro Localization to the Laminae Rarae by Cationic Probes. J. Cell Biol. 81, 137 (1979).

Kefalides, N.A., Isolation of Collagen from Basement Membrane Containing three Identical α -Chains. Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 226 (1971).

Kefalides, N.A., Structure and Biosynthesis of Basement Membranes. Int. Rev. Conn. Tiss. Res. 6, 63 (1973).

Kefalides, N.A., Alper, R., and Clark, C.C., Biochemistry and Metabolism of Basement Membranes. Intern. Rev. Cytol. 61, 167 (1979).

Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voss, T., and Glanville, R.W., Macromolecular Structure of Basement Membrane Collagens : Identification of 7S - Collagen as Crosslinking Domain of Type IV Collagen. FEBS Lett. 125, 123 (1981).

Kresina, T.F., Miller, E.J., Isolation and Characterization of Basement Membrane Collagen from Human Placental Tissue. Evidence for the Presence of two Genetically Distinct Collagen Chains. Biochemistry 95, 983 (1979).

Leivo, I., Vaheri, A., Timpl, R., and Wartiovaara, J., Appearance and Distribution of Collagen and Laminin in the Early Mouse Embryo. Developm. Biol. 76, 100 (1981).

- Liotta, L., Tryggvason, K., Garbisa, S., Gehron Robey, P., Murray, J.C., Interaction of Metabolic Tumor Cells with Basement Membrane Collagen. Cancer Campaign, Metastatic Tumor Growth (Grundman ed.). G. Fischer Verl., Stuttgart (1980).
- Lottspeich, F., Identification of the Phenylthiohydantoin Derivatives of Amino Acids by High Pressure Liquid Chromatography, Using a Ternary, Isocratic Solvent System. Hoppe Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 361, 1829 (1980).
- Majamaa, K., Effect of Prevention of Procollagen Triple Helix Formation on Proline 3-Hydroxylation in Freshly Isolated Chick-Embryo Tendon Cells. Biochem. J. 196, 203 (1981).
- Mayne, R. and Zettergren, J.G., Type IV Collagen from Chicken Muscular Tissues. Isolation and Characterization of the Pepsin Resistent Fragments. Biochemistry 19, 4065 (1980).
- Miller, E.J., Biochemical Characterization and Biological Significance of the Genetically-Distinct Collagens. Mol. Cell. Biochem. 13(3), 165 (1976).
- Minor, R.R., Clark, C.C., Strause, E.L., Koszalska, T.R., Brent, R.L. and Kefalides, N.A., Basement Membrane Procollagen is not Converted to Collagen in Organ Culture of Parietal Yolk Sac Endoderm. J. Biol. Chem. 251, 1789 (1976).
- Ohkubo, H., Vogeli, G., Mudryj, M., Avvedimento, V.E., Pastan, I., and de Crombrughe, B., Isolation and Characterization of Overlapping Genomic Clones Covering the Chick $\alpha 2$ (Type I) Collagen Gene. Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 7059 (1979).

Orkin, R.W., Gehron, P., Mc Goodwin, E.B., Martin, G.R., Valentine, T., Swarm, A., A Murine Tumor Producing a Matrix of Basement Membranes. *J. Exp. Med.* 145, 204 (1977).

Pierce, G.B., Epithelial Basement Membrane : Origin, Development and Role in Disease. In "Chemistry and Biology of the Intercellular Matrix". Balasz, E.A.(ed.). Acad. Press 471 (1970).

Rauter, A. and Glanville, R.W., Pepsin Fragments of Human Placental Type IV Collagen. *Hoppe Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem.* 362, 943 (1981).

Reid, K.B.M., Complete Amino Acid Sequences of the three Collagenlike Regions Present in Subcomponent Clq of the First Component of Human Complement. *Biochem.J.* 179, 367 (1979).

Risteli, J., Bächinger, H.P., Engel, J., Furthmayr, H., and Timpl, R., 7S Collagen : Characterization of an Unusual Basement Membrane Structure. *Eur. J. Biochem.* 108, 239 (1980).

Sakakibara, S., Inouye, K., Shudo, K., Kishida, Y., Kobayashi, Y., and Prockop, D.J., Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of Defined Molecular Weights. Evidence for the Stabilisation of the Collagen Triple Helix by Hydroxyproline. *Biochem. Biophys. Acta* 303, 198 (1973).

Schuppan, D., Timpl, R., and Glanville, R.W., Discontinuities in the Triple Helical Sequence Gly-X-Y of Basement Membrane (Type IV) Collagen. *FEBS Lett.* 115, 297 (1980).

- Schuppan, D., Diplomarbeit, Universität München (1980).
- Timpl, R., Martin, G.R., Bruckner, P., Wick, G., and Wiedemann, H., Nature of the Collagenous Proteins in a Tumor Basement Membrane. *Eur. J. Biochem.* 84, 43 (1978).
- Timpl, R., Bruckner, P., and Fietzek, P., Characterization of Pepsin Fragments of Basement Membrane Collagen Obtained from a Mouse Tumor. *Eur. J. Biochem.* 95, 255 (1979).
- Timpl, R., Rohde, H., Gehron Robey, P., Rennard, S.I., Foidart, G.M., and Martin, G.R., Laminin- a Glycoprotein from Basement Membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933 (1979).
- Timpl, R. and Martin, G.R., Components of Basement Membranes. In "Immunocytochemistry of the Extracellular Matrix" Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida (1981).
- Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H., and Kühn, K., A Network Model for the Organisation of Type IV Collagen Molecules in Basement Membranes. *Eur. J. Biochem.* 120, 203 (1981).
- Traub, W. and Fietzek, P., Contributions of the $\alpha 2$ -Chain to the Molecular Structure of Collagen. *FEBS Lett.* 68(2), 245 (1976).
- Tryggvason, K., Majamaa, K., and Kivirikko, K.I., Prolyl 3-Hydroxylase and 4-Hydroxylase Activities in Certain Rat and Chick Embryo Tissues and Age-Related Changes in the Activities in the Rat. *Biochem. J.* 178, 127 (1979).

Tryggvason, K., Gehron Robey, P., and Martin, G.R., Biosynthesis of Type IV Procollagen. *Biochemistry* 19, 1284 (1980).

Vracko, R., Basal Lamina Scaffold. In *Frontiers of Matrix Biol.* 7, 78 (1979).

Wu, G.Y., Pereira, B., and Seifter, S.; *Biochemistry* 20, 4321 (1981).

Yamada, Y., Avvedimento, V.É., Mudryj, M., Ohkubo, H., Vogeli, G., Irani, M., Pastan, I., and de Crombrughe, B., The Collagen Gene : Evidence for its Evolutionary Assembly by Amplification of a DNA-Segment Containing an Exon of 54 Bases. *Cell* 22, 887 (1980).

Lebenslauf

Als Sohn des Dr.jur.Walter Schuppan und seiner Frau Helga, geb. Pahnke, wurde ich am 9.8.1954 in Essen, NRW, geboren. Nach der Volksschule besuchte ich von 1965-1973 das humanistische Burggymnasium in Essen, wo ich die Reifeprüfung ablegte. 1973 begann ich das Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Meine Diplomarbeit schloß ich im Dezember 1979 im Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Bindegewebsforschung, ab. Die vorliegende Doktorarbeit, begonnen im Januar 1980, schließt sich thematisch an die Diplomarbeit an. Seit dem SS 1979 studiere ich außerdem das Fach Humanmedizin. Im Juni 1981 übernahm ich die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten an der Medizinischen Klinik in Marburg/Lahn in dem Projekt "Pathobiochemie der Leberfibrose".

